

Experimentelle Untersuchungen zur oralen Immunisierung gegen Mäusepocken

Rainer Hoffmann

1973

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. E. Dahme

Angefertigt unter Leitung von: Akad. Dir. Priv. Doz. Dr. E. Munz

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ORALEN IMMUNISIERUNG
GEGEN MÄUSEPOCKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Rainer Hoffmann
aus
Riesa/Elbe

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Akad.Dir. Priv. Doz. Dr. E. Munz

Korreferent: Prof. Dr. Dr. hc. A. Mayr

Tag der Promotion: 23.2.1973



Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., 8135 Söcking/Starnberg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. SCHRIFTTUM	2
1. Allgemeines über Pockeninfektionen der Tiere und deren Prophylaxe	2
2. Die Mäusepocken	5
2.1 Definition	5
2.2 Vorkommen, Verbreitung und Bedeutung der Mäusepocken	5
2.3 Der Erreger der Mäusepocken	5
2.3.1 Eigenschaften des Erregers	5
2.3.2 Züchtung	7
2.3.2.1 Züchtung im Brutei	7
2.3.2.2 Züchtung in Gewebekulturen	7
2.4 Das Krankheitsbild der Mäusepocken	8
2.4.1 Verlaufsformen und Pathogenese	8
2.4.1.1 Die perakute und akute Form der Krankheit	8
2.4.1.2 Die chronische Form der Krankheit	10
2.4.1.3 Die klinisch inapparente (latente) Form der Krankheit	11
2.4.2 Pathologische Anatomie und Histologie	12
2.4.3 Übertragungsweise und Virusausscheidung	14
2.4.4 Immunitätsverhältnisse bei den Mäusepocken	14
2.4.5 Diagnose	16
2.4.6 Bekämpfung und Kontrollmaßnahmen	17
3. Die Schutzimpfung gegen Mäusepocken, Impfmethode und -stoffe	18
4. Die orale Immunisierung	19
4.1 Grundlagen	19
4.2 Die orale Immunisierung gegen Pockenvirusinfektionen	21
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	23
I. Material und Methoden	23
1. Zellkulturen	23

	Seite
2. Virusstämme	24
3. Viruszüchtung	24
4. Titrierungen	26
5. Tiermaterial, Haltungs- und Versuchsbedingungen	26
6. Prüfung der Impfstoffe auf ihre Verwendbarkeit als Trinkvakzine	27
7. Immunisierungsmethoden	27
8. Belastungsversuch mit virulentem Ektromelievirus	29
9. Prüfung auf pathologische Veränderungen	33
10. Serumgewinnung	33
11. Hämagglutinationshemmungs (HAH)-Test	33
II. Versuche und Ergebnisse	36
1. Versuche zur oralen Aufnahme von Virussuspensionen	36
2. Verträglichkeit der verabreichten Impfstoffe	37
3. Untersuchungen zur Wirksamkeit einer oralen Immuni- sierung	38
3.1 Ergebnisse des Vorversuches	38
3.2 Ergebnisse des 1. Hauptversuches	41
3.3 Ergebnisse des 2. Hauptversuches	44
D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	47
E. ZUSAMMENFASSUNG	55
F. LITERATURVERZEICHNIS	60

A. EINLEITUNG

Die Mäusepocken sind eine weit verbreitete Krankheit. Sie stellt für Kleinzüchter, in besonders großem Maße jedoch für moderne Massenzuchten eine erhebliche Gefährdung dieses wichtigsten Versuchstieres dar. Brechen Mäusepocken in pathogen-frei gehaltenen Zuchten aus, so müssen die Bestände als verloren betrachtet werden. Doch nicht nur die hohe Mortalität der akuten Verlaufsformen, sondern auch subklinisch und latent verlaufende Infektionen werden gefürchtet. Sie machen das damit belastete Tiermaterial für geplante Untersuchungen aller Art wertlos, beziehungsweise sie führen zu Fehlinterpretationen, wenn bereits im Versuch stehende Tiere infiziert werden.

Zur Vorbeugung impft man schon seit Jahren gegen die Mäusepocken mit intraperitoneal oder kutan appliziertem Vacciniavirus. Beide Methoden sind bei der Durchimpfung großer Bestände arbeitstechnisch sehr aufwendig. Zeit- und kostensparende Impfverfahren sind deshalb wünschenswert, um eine rationelle Durchführung von Massenimpfungen zu ermöglichen.

Die orale Vakzinierung gegen Kinderlähmung und die Trinkwasservakzinierung gegen Newcastle-Disease gaben in neuerer Zeit mehrfach Anlaß, diese Immunisierungsmethoden auch für andere Viruskrankheiten zu testen. Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der Pockenvirusinfektionen bestärkten derartige Überlegungen auch für diese Krankheitsgruppe.

Es ist Aufgabe vorliegender Arbeit zu untersuchen, ob eine orale Schutzimpfung gegen Mäusepocken möglich ist. Dabei sollten insbesondere Fragen der Unschädlichkeit und Wirksamkeit dieser Methode bei Verwendung eines attenuierten und eines nicht attenuierten Vacciniavirus-Stammes geklärt werden.

B. SCHRIFTTUM

1. Allgemeines über Pockeninfektionen der Tiere und deren Prophylaxe

Pockenviren können Erkrankungen unterschiedlicher Verlaufsform hervorrufen. Im wesentlichen unterscheidet man nach HERRLICH (31) 5 Hauptformen:

1. Die generalisierte Form, 2. die septikämisch-toxische Form, 3. Auftreten einzelner Läsionen an bestimmten Körperstellen (lokale Form), 4. latente und subklinische Verlaufsformen und 5. eine sogenannte Sonderform.

Die generalisierte Form ist das Ergebnis eines zyklischen Ablaufes der Infektion. Sie ist durch ein allgemeines Exanthem an Haut und Schleimhaut charakterisiert. Die Art des Exanthems hängt vom Erreger ab. Es können Papeln, Bläschen und Pusteln, Myxome, Fibrome und Histiocytome entstehen.

Die Pathogenese der zyklischen Pockeninfektionen besitzt besondere Charakteristika. So ist das virämische Stadium im Gegensatz zu einer bakteriellen Sepsis in seiner zeitlichen Dauer immer beschränkt, und seine Quantität hängt von der Krankheit ab. Stets verschwinden jedoch die Erreger wieder aus dem Blut, um sich im endgültigen Erfolgsorgan anzusiedeln (Organmanifestation). Für das Zustandekommen einer generalisierenden Virämie ist die Virusvermehrung in Leber, Milz und Knochenmark verantwortlich. Sie werden als sogenannte primär affine Organe angesehen. Dorthin gelangt der Erreger von der Eintrittspforte über eine erste Virämie, um sich in ihnen während der Inkubationszeit zu vermehren. Das Ausmaß der Vermehrung hängt von der Virulenz des Virusstammes ab. Erst wenn eine gewisse Virusmenge in den primär affinen Organen vorhanden ist, kommt es zu einer zweiten Virämie mit anschließender generalisierter Organmanifestation. Anscheinend genügt zur Auslösung dieser Vorgänge die Virusmenge

nicht, die von der Eintrittspforte aus in den Körper gelangt.

Bekannte Beispiele für generalisierte Verlaufsformen von Pockeninfektionen der Tiere sind die Schaf- und Ziegenpocken, die Lumpy-Skin-Disease der Rinder, die Hühner, Kanarien- und Taubenpocken, die Kaninchenpocken, die Myxomatose und Fibromatose der Kaninchen, bestimmte Affenpocken, die originären Schweinepocken und die Mäusepocken.

Die septikämisch-toxische Form bei Pockeninfektionen ist Ausdruck eines perakuten Krankheitsverlaufes. Zu einer vollen Ausbildung von Pockensymptomen kommt es dabei in der Regel nicht mehr, weil der Tod bereits im Stadium der zweiten Virämie eintritt. Verantwortlich für ein solch dramatisches Krankheitsgeschehen scheint ein noch nicht näher definiertes Pockenvirustoxin zu sein, das jedoch nur bei hohen Viruskonzentrationen wirkt und bevorzugt am Gefäßsystem angreifen soll. Septikämisch-toxische Verlaufsformen hat man bei Kanarien- und bei Mäusepocken am häufigsten beobachtet.

Bei der lokalen Form sind die Pockeneruptionen auf bestimmte Körperstellen (Haut oder Schleimhaut, bestimmte Organe) begrenzt. Häufig vorkommende und hierher gehörende Pockenerkrankungen der Tiere sind die Infektionen mit Parapoxviren (Orf der Schafe und Ziegen, Stomatitis papulosa des Rindes und die Euterpocken). Die kutane Vakzinierung löst ebenfalls im allgemeinen nur lokale Pockenläsionen aus. Stressfaktoren und eine Herabsetzung der Resistenz können jedoch dazu beitragen, daß diese lokale Verlaufsform in eine generalisierte übergeht.

Latente Pockeninfektionen sind durch eine lange Persistenz des Erregers im Organismus charakterisiert, wobei es allerdings nicht zu Krankheitssymptomen kommt. Der Übergang zu subklinischen Verlaufsformen, bei denen eine Antikörpersti-

mulierung beobachtet wird, ist fließend. Diese beiden in-apparenten Formen können durch Stressoren der verschiedensten Art in eine klinisch apparente Form übergeführt werden. Bevorzugt beobachtet man latente und subklinische Infektionen bei den Mäusepocken und der Myxomatose der Kaninchen. Auch bei der Parapoxvirusinfektion werden sie diskutiert.

Der Sonderform der Pockeninfektionen werden pathologische Prozesse zugeordnet, die in das dargelegte Schema nicht eingeordnet werden können. Hierher gehört das Entstehen tumorähnlicher Veränderungen bei der Yabavirus-Infektion der Affen, sowie durch allergische Prozesse komplizierte generalisierte oder septikämisch-toxische Verlaufsformen, die allerdings bei Pockeninfektionen der Tiere nicht vorzukommen scheinen.

Zur Prophylaxe der Tierpockeninfektionen eignen sich nur Lebendimpfstoffe. Als besonders wirksam haben sich dabei solche Impfstoffe erwiesen, deren wirksames Prinzip auf aktiven, homologen und künstlich attenuierten Erregern beruht. Es werden jedoch auch solche Vakzinen eingesetzt, die immunogen wirksame, heterologe Virusarten enthalten.

Die Pockenimpfstoffe rufen in der Regel eine gute und belastbare Immunität hervor.

Verschiedene Formen der Immunisierung sind gegen Pockeninfektionen möglich. Kutan und perkutan wird bevorzugt gegen Avipox-Infektionen geimpft. Hierbei entwickeln sich an der Impfstelle als Zeichen einer positiven Impfreaktion lokale Pockenläsionen. Subkutan wird zum Beispiel der Impfstoff gegen Lumpy-Skin-Disease und die Schafpockenvakzine appliziert. Als häufigste Impfmethode gegen Mäusepocken wird die intraperitoneale Vakzination verwendet.

2. Die Mäusepocken

2.1 Definition

Als Mäusepocken wird eine bei dieser Tierart sehr verbreitete und hochkontagiöse Viruskrankheit bezeichnet. In ihrem Verlauf können Amputationen an Schwanz und Gliedmaßen auftreten, MARCHAL (45) gab ihr deshalb den Namen "Infektiöse Ektromelie".

2.2 Vorkommen, Verbreitung und Bedeutung der Mäusepocken

Die Mäusepocken sind eine spezifische Erkrankung dieser Tierart. Der Erreger ist anscheinend sowohl unter Wildmäusen (29), als auch unter konventionell gehaltenen und gezüchteten Labormäusen weit verbreitet. Über ein spontanes Auftreten der Seuche in Mäusezuchten wird aus Amerika und verschiedenen Ländern Europas berichtet. Die Ektromelie stellt für alle Mäusezuchten eine große Gefahr in zweierlei Hinsicht dar: Bei akutem oder perakutem Verlauf führt sie zu erheblichen Verlusten. Noch bedeutsamer, weil heimtückischer ist jedoch ihre latente bzw. subklinische Form. Diese kann in angeblich gesunden und einwandfreien Versuchstieren durch Stressoren verschiedenster Art einen klinisch-apparenten Verlauf annehmen. Fehldeutungen von pharmakologischen und toxikologischen Experimenten sowie von Infektionsversuchen mit anderen Erregern sind dann möglich. (Eine Ausnahme bilden die nur wenigen Zuchtlinien mit einer genotypisch fixierten Resistenz gegenüber dem Ektromelievirus (so z.B. der Stamm C 57 Be) (64, 65).

2.3 Der Erreger der Mäusepocken

2.3.1 Eigenschaften des Erregers

Das Mäusepocken-Virus (Ektromelie-Virus) gehört als Orthopoxvirus muris zur Genus Orthopoxvirus der Familie Poxviridae.

Mit den anderen Orthopoxviren besitzt es viele Gemeinsamkeiten in seiner Morphologie und Antigenität, seinem chemischen Aufbau und biologischen Verhalten (47).

Zur Unterscheidung gegenüber anderen Orthopoxviren können jedoch folgende Kriterien herangezogen werden: Bei der Vermehrung von Mäusepocken-Virus in infizierten Zellen kommt es zur Bildung von typischen intrazytoplasmatisch gelegenen Einschußkörperchen, die anscheinend größer sind, als nach einer Infektion mit Vaccinia-Virus. Man unterscheidet dabei den Typ A, auch BIRCH-HIRSCHFELD'sche oder MARCHAL'sche Einschußkörperchen genannt, und den Typ B, der bei allen Pockeninfektionen entsteht. Bei Typ A handelt es sich dagegen um eine für Mäusepocken spezifische Zellreaktion, die nicht aus virusspezifischem Material besteht.

Ein besonderes Charakteristikum des Ektromelievirus ist seine Fähigkeit, neben Hühnererythrozyten auch solche von Mäusen zu agglutinieren. Serologisch und immunologisch verhalten sich die verschiedenen Erregerstämme einheitlich, wenn auch große Unterschiede in ihrer Virulenz bestehen. Auch noch andere biologische und pathogene Eigenschaften des Mäusepockenvirus, insbesondere sein Verhalten in verschiedenen Wirtssystemen, können zur Differenzierung gegenüber anderen Orthopoxviren herangezogen werden. Als besonders geeignetes Differentialdiagnostikum gilt hierbei die Art und Weise seiner Vermehrung auf der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühneries und in bestimmten Zellkulturen.

Bemerkenswert ist, daß keine anderen Tierarten nach einer Infektion mit Ektromelievirus klinische Symptome einer Pocken-erkrankung zeigen. Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen und Affen erkranken selbst nach Infektion mit hohen Dosen nicht. Auch für den Menschen ist das Virus apathogen (53).

2.3.2 Züchtung

2.3.2.1 Züchtung im Brutei

Das embryonierete Brutei stellt wohl das geeignetste Fremdwirtssystem für das Ektromelievirus dar. Grundlegende Arbeiten zur Pathogenese der Ektromelie-Infektion im Brutei stammen von BURNET und LUSH (10), in neuerer Zeit von HERRLICH und MAYR (32). Danach kommt es, erfolgt die Infektion auf die Chorioallantoismembran 9 - 11 Tage bebrüteter Eier nach etwa 3 - 4 Tagen zur Bildung kleiner, typischer, proliferativer Pocken-Knötchen und unter bestimmten Bedingungen zu Generalisationszeichen des Erregers im Embryo und dessen außerembryonalen Anhangsorganen. Das zeitliche Auftreten und die Morphologie der Veränderungen auf der Chorioallantoismembran können differentialdiagnostisch gegenüber anderen Pockenvirusinfektionen verwendet werden. Die Virusausbeute nach Beimpfung der Chorioallantoismembran ist groß, während sich dafür die Infektion von Bruteiern auf andere Art und Weise weniger eignet.

2.3.2.2 Züchtung in Gewebekulturen

In vitro läßt sich das Mäusepocken-Virus in den verschiedensten Zellsystemen homologer und heterologer Art anzüchten. Es zeigt hierbei bei weitem keine so strenge Wirtsspezifität wie in vivo.

Als erster brachte es BIRCH-HIRSCHFELD in Milz- und Hodengewebe des Kaninchens, in Milz- und Lebergewebe der Maus und in der Haut von Mäuseembryonen zur Vermehrung (5). Später wurde das Virus auf Kulturen aus Rattengewebe, aus embryonalem Mäusegewebe (15), in Kaninchenkorneaepithelien sowie in Zellkulturen aus embryonalen Rindermuskeln und in Zellen menschlichen Ursprungs (2) gezüchtet. Als besonders geeignet zur Vermehrung von Ektromelie-Virus erwiesen sich Hühnerembryofibroblasten-Kulturen (15). Die Vermehrung in einschichtigen Zellkulturen erbringt nicht nur höhere Virustiter als

in den Gewebsexplantaten, sondern es tritt auch ein zytopathischer Effekt auf, der zur Differenzierung mit herangezogen werden kann. Er beginnt etwa 16 Stunden p.i., wobei es in Mäuseembryozellkulturen zum Auftreten von Riesenzellen kommt, und endet in der Regel am 4. Tag p.i. mit einer Lysis der Zellen.

Der zytopathische Effekt besitzt jedoch geringere Aussagekraft in diagnostischer Hinsicht, als die Herdbildung auf der Chorioallantoismembran des Bruteies.

2.4 Das Krankheitsbild der Mäusepocken

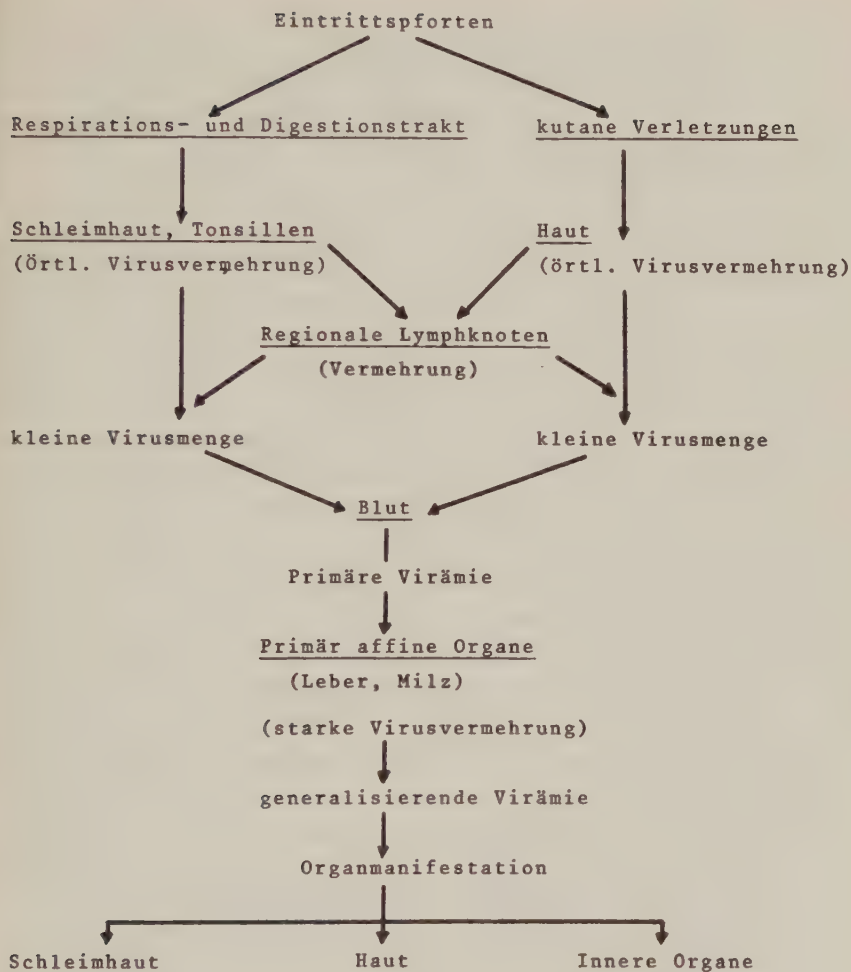
2.4.1 Verlaufsformen und Pathogenese

Je nach Immunitätslage und abhängig von verschiedensten Umweltfaktoren zeigen sich die Mäusepocken in einer perakuten und akuten, einer chronischen und einer klinisch inapparenten, latenten Verlaufsform.

2.4.1.1 Die perakute und akute Form der Krankheit

Diese Form läuft als zyklische Infektion ab. Sie diente FENNER 1949 als Modell für den Ablauf der Ereigniskette zyklischer Infektionskrankheiten (25). Einen Überblick hierzu gibt Schema Nr. 1.

Danach lassen sich diese Vorgänge wie folgt zusammenfassen: Nach Aufnahme des Virus (oral, nasal, kutan) kommt es zu einer ersten örtlichen Vermehrung des Erregers in der Schleimhaut und Haut, in den Tonsillen und anderen regionalen Lymphknoten. Im Verlaufe der sich anschließenden primären Virämie werden die sogenannten primär affinen Organe, Leber und Milz, etwa am 3. Tage p.i. befallen (20). Es kommt in diesen zu einer starken Virusvermehrung, die den weiteren Verlauf der Krankheit bestimmt. Dabei treten am 6. Tag p.i. in diesen Organen massive Nekrosen auf. Diese können bereits jetzt zum Tode führen (24). Zu diesem Zeitpunkt ist die Leber stark virushaltig, während in Milz und übrigen Organen nur geringe Virusmengen nach-



Schema Nr. 1: Pathogenese der Mäusepocken

weisbar sind (52). Besondere klinische Symptome zeigen die Tiere bei einem solchen perakuten Verlauf nicht. Sie sterben plötzlich aus scheinbarem Wohlbefinden analog dem Geschehen bei einer Septikämie. Einer intraperitonealen Infektion folgt bei entsprechend hoher Dosierung immer eine perakute, tödlich verlaufende Erkrankung ohne Hauterscheinungen (24). Bei diesem Infektionsmodus soll bei tragenden Mäusen auch eine Schädigung der Embryonen eintreten (62).

Ist jedoch die Schädigung, insbesondere der Leber, nicht so stark, so kommt es zu einer sekundären Virämie, die zur Verbreitung des Virus im gesamten Körper und zur eigentlichen Organmanifestation, das heißt zum Befall der Haut, Schleimhaut und der inneren Organe führt. Dabei bestehen fließende Übergänge von der akuten zur mehr subakuten Verlaufsform.

Bei mehr subakutem, verzögertem Ablauf der Mäusepocken kann es zu typischen Symptomen mit Veränderungen an Haut und Extremitäten kommen, die besonders für die chronische Form charakteristisch sind. Von akuten Verlaufsformen sind hauptsächlich Mäuse nach dem Absetzen und empfängliche Tiere, die in eine verseuchte Population kommen, betroffen. Die Todesraten sind sehr hoch.

2.4.1.2 Die chronische Form

Einen verzögerten Ablauf der Krankheit findet man, wenn die Virusmenge in Leber und Milz weniger stark ist. Es kommt über eine sekundäre, generalisierende Virämie zur Organmanifestation, wobei jetzt besonders die Haut betroffen ist. Die charakteristischen Zeichen der chronischen Form sind Schwellungen des Kopfes im Bereich von Schnauze und Kiefer, - man spricht vom "Mumpsgesicht" -, Konjunktivi-

tis und Blepharitis, glasig-ödematöse Schwellungen der Haut mit gelegentlichen Ulzerationen. Deutliche Einschnürungen demarkieren die veränderten Körperteile gegen das gesunde Gewebe, wobei es zu Verlust von Extremitäten und Schwanz kommen kann.

Bei dieser Verlaufsform findet über die erregerhaltigen Hautveränderungen eine große Virusstreuung statt, die zur Ansteckung bislang gesunder Tiere führen kann. In größeren Abständen auftretende Rezidive bei Mäusen, die die Infektion überstanden haben, verlaufen in Bezug auf die Hautveränderungen immer milder (28, 62). Bei Tieren, die eine gewisse Resistenz gegenüber der Mäusepockeninfektion besitzen, müssen die genannten Veränderungen nicht so deutlich auftreten. Oft entsteht nur am primären Infektionsort, meist ist eine der Hinterpfoten betroffen, eine umschriebene, glasig durchscheinende Schwellung der Haut, die sich bald ödematös, feucht und entzündlich verändert. Bei positiver Immunitätslage schwindet die Schwellung und es kommt zu einer Restitutio ad integrum oder Narbenbildung, beziehungsweise tritt Gangränesezierung mit anschließender Amputation des nekrotischen Körperteiles ein. Die Amputationen können nur eine Zehe, einen Fuß oder auch alle vier Extremitäten sowie den Schwanz betreffen. Nach Heilung des Stumpfes genesen die Tiere schnell und machen einen mobilen Eindruck (60, 62). Überwiegend erkranken auf diese Weise ältere Tiere, doch ist die Letalität zumeist nur gering.

2.4.1.3 Die klinisch inapparente (latente) Form der Krankheit

In enzootisch verseuchten Mäusepopulationen verlaufen die Mäusepocken oft völlig inapparent. Nach RÖHRER (60) liegt die Infektion dann in latenter Form vor.

In epizootiologischer Hinsicht ist diese Form von besonderer

Bedeutung. Über scheinbar gesunde, jedoch latent infizierte Tiere erfolgt die Verschleppung des Virus mit infektiösem Kot und virushaltigen Hautabschilferungen und seine Übertragung in andere empfängliche Zuchten. Durch Resistenzminderung und Stressoren verschiedenster Art, im Falle der Labormaus besonders durch Tierversuche, kann es zur Aktivierung dieser latenten Infektion der Mäusepocken kommen.

GLEDHILL (27) erzeugte die latente Form, indem er per os geringe Virusdosen mit der Sonde an Mäuse verabreichte. Die Tiere beherbergten den Erreger lange im Intestinaltrakt und schieden ihn mit dem Kot, aber auch über die Haut aus. Auf diese Art soll eine Übertragung des Erregers von Generation zu Generation erfolgen.

HORZINEK und HÖPKEN (40) gingen auf ähnliche Weise vor, um inapparente Mäusepocken hervorzurufen. Sie wiesen dabei nach, daß Tiere, die auf diese Weise per os infiziert wurden oder Kontakt mit derart infizierten Tieren hatten, dann eine intraperitoneale Belastungsinfektion von 10^6 LD₅₀-Einheiten überlebten, wenn sie enteral mehr als 10^3 LD₅₀-Einheiten erhalten hatten. Die enterale Infektion wirkte immunisierend, denn hämagglutinationshemmende Antikörper waren nachweisbar. Vieles spricht dafür, daß es nach peroraler Aufnahme geringer Virusmengen praktisch immer zu einer inapparenten Infektion kommt.

GERMER et al. (26) beschreiben auch die latente Infektion von Mäuseembryonen mit Ektromelievirus infolge diaplazentarer Übertragung.

2.4.2 Pathologische Anatomie und Histologie

Das pathologisch-anatomische Bild an Mäusepocken verendeter Tiere variiert entsprechend der Verlaufsform stark.

Häufig findet man bei der Sektion in Brust- und Bauchhöhle reichlich Exsudat. Als typisch werden besonders bei der akuten Form Veränderungen an Leber und Milz angesehen (5, 20, 25, 45). Die Leber ist nach RÖHRER (60) vergrößert, in perakuten Fällen schmutziggrau verfärbt, feucht, weich und mit feinen Blutungen durchsetzt; in weniger akuten Fällen ist sie von normaler Farbe oder tiefrot mit weißlichen Stippchen übersät. Histologisch stehen Blutaustritte und nekrobiotische Herde im Vordergrund, die Neigung zum Konfluieren zeigen.

Die Milz ist regelmäßig geschwollen, dunkelrot und bei längerer Krankheitsdauer mit weißlichen Herden von etwa 1 mm Durchmesser durchsetzt. Neben einer Hyperplasie der Retikulumzellen kommt es zu Nekrobiose der Lymphfollikel sowie der roten Pulpa.

Regionäre Lymphknoten nahe der primären Eintrittspforte zeigen nekrobiotische Herde.

Die Nieren sind in der Regel unverändert.

In den Lungen treten Stauungen und Verdichtungen auf. Der Darmkanal zeigt oft entzündliche Erscheinungen unterschiedlicher Stärke in Mucosa und Submucosa.

Die charakteristischen Hautveränderungen der subakuten und chronischen Verlaufsformen imponieren als herdförmige und ödematöse Schwellungen der Kutis und Subkutis. Es kommt zu Papelbildungen und ulzerativen Prozessen mit ausgedehnten Hautnekrosen. Die Nekrosen sequestrieren unter Schorfbildung mit lympho- und leukozytärer Infiltration, unter Kernpyknose und Karyolyse (60).

Intrazytoplasmatisch gelegene, acidophile Einschlusskörperchen sind in folgenden Zellen nachweisbar: In Leberzellen, in den Zellen der Follikelkeimzentren der Milz, in Lymphknotenzellen, in Epithelzellen der Schleimhaut und Epider-

mis sowie in den Zellen des Pankreas und der Speicheldrüsen.

2.4.3 Übertragungsweise und Virusausscheidung

Während FENNER (19) die Infektion von kleinen Hautverletzungen als natürlichen Ansteckungsweg ansieht, nimmt BRIODY (8) an, daß der Respirationstrakt die Eintrittspforte für das Virus darstellt. Daneben wird in neuerer Zeit besonders die perorale Aufnahme des Virus (Putzhandlungen, Kannibalismus) als wichtiger Infektionsmodus angenommen (27, 40). Die Möglichkeit einer diaplazentaren Übertragung wurde bereits erwähnt (26).

Die Ausscheidung des Virus (7. - 21. Tag p.i.) geht von offenen Hautläsionen erkrankter Tiere aus. Nach FENNER (25) wird das Virus auch mit Kot, Harn und Speichel verbreitet.

Zur artifiziellen Infektion werden Extrakte aus infizierten Lebern, Milzen und anderen virushaltigen Organen verwendet. Das Virus kann intradermal, intraperitoneal, intravenös, subkutan, intranasal, intracerebral und peroral bei Mäusen zur Haftung gebracht werden.

Besonders empfänglich für künstliche Infektionen sind Säuglingsmäuse, sowie die über 1 Jahr alten Tiere, während Mäuse im Alter von 2 - 10 Monaten am widerstandsfähigsten sind.

2.4.4 Immunitätsverhältnisse bei den Mäusepocken

Im Verlaufe einer natürlichen und künstlichen Infektion mit Ektromelievirus kommt es zur Ausbildung komplementbindender, neutralisierender, präzipitierender und hämagglutinationshemmender Antikörper. Besonders letztere sind in Bezug auf die Serologie der Mäusepocken von Interesse. Je nach Infektionsmodus sind sie schon relativ kurze Zeit p.i. nachweisbar. Bei einer enteralen Infektion hängt der Zeitraum, der mit der HAH-Reaktion serologisch erfaßbaren Durchseuchung von der in ein Mäusekollektiv eingebrachten Virus-

dosis ab. Die Antikörperbildung setzt bei höherer Infektionsdosis um den 9. Tag p.i. ein, werden dagegen nur geringe Virusmengen aufgenommen, so kommt es zu einer Verzögerung des Beginns der Antikörperbildung um etwa 3 Tage (40). Bei intraplantarer, intranasaler und intraperitonealer Infektion kommt es innerhalb weniger Tage zu einem raschen Titeranstieg, der allerdings bei intraplantarer Infektion nicht an die Titerhöhe der beiden anderen Infizierungsmodi herankommt (39). Der Titergipfel wird ungefähr 14 Tage p.i. erreicht. Mit zunehmender Zeit fallen die Titer bei allen Infektionsarten kontinuierlich ab und unterschreiten bei einzelnen Tieren nachweisbare Werte bereits nach wenigen Monaten.

Als Beweis für eine bestehende, belastbare Immunität darf eine positive Hämagglutinationshemmungs-Reaktion jedoch nicht herangezogen werden, hat sich doch erwiesen, daß auch ohne das Auftreten hämagglutinationshemmender Antikörper eine gute Immunität vorhanden sein kann. Dies beruht darauf, daß zwischen einer humoralen- und einer Gewebs-Immunität unterschieden werden muß. Während erstere serologisch nachweisbar ist, kann letztere nur der Belastungsversuch beweisen (49, 57). Erfahrungen über die Anwendung der Leukozytolyse (17) zum Nachweis einer zellulären Immunität liegen bei der Ektromelie noch nicht vor.

Das Überstehen der Mäusepocken führt in der Regel zu einer guten und dauerhaften Immunität (21). FENNER (22) gibt an, daß sie nur langsam absinkt. Eine nach einem Jahr vorgenommene Testinfektion verursacht nur eine Vermehrung des Virus an der Infektionsstelle ohne generalisierte Erkrankung.

In latent verseuchten Zuchten besitzen Säuglingsmäuse oft einen völligen oder partiellen Schutz aufgrund diaplazen-

tarer und kolostraler Antikörperübertragung.

2.4.5 Diagnose

Die subakuten und chronischen Verlaufsformen der Ektromelie können zumeist anhand des ausgeprägten klinischen Bildes diagnostiziert werden. Akute und latente Infektionen erfordern zusätzliche Untersuchungsverfahren. Hier kann die Diagnose durch den Erregernachweis (elektronenmikroskopisch, Isolierung in Zellkulturen und Bruteiern, Übertragungsversuche auf gesunde Tiere, Immunfluoreszenzreaktion, Immunopräzipitationsteste, histologisch (Einschlußkörperchen, sonstige pathologische Veränderungen) und serologisch (Nachweis der verschiedenen Antikörperarten) sowie unter Berücksichtigung epidemiologischer Verhältnisse gestellt werden.

Bei der Erregerisolierung ist die Methode der Wahl die Verimpfung von Organverreibungen (Leber, Milz) auf die Chorioallantoismembran 10 Tage bebrüteter Hühnereier (Bebrütungstemperatur $+ 35^{\circ}\text{C}$).

Der fluoreszenzserologische Antigennachweis ist nach den bisherigen Erfahrungen nur beim Vorliegen deutlicher Haut- und Organveränderungen erfolgreich, während inapparente Verlaufsformen nicht erkannt werden können (12, 43).

Nach HORZINEK (38) ist eine latente Infektion mit Hilfe der Agargel-Präzipitation nachweisbar.

Von den serologischen Methoden zum Nachweis von Antikörpern hat sich als geeignetste Technik der Hämagglutinationshemmungs-Test erwiesen (37, 61, 67). Andere serologische Verfahren (Neutralisationsteste, Komplementbindungsreaktionen) sind sehr arbeitsaufwendig und eignen sich nicht so gut für Reiehnuntersuchungen, bzw. sie sind nicht empfindlich genug.

Differentialdiagnostisch müssen besonders Bißverletzungen

in Betracht gezogen werden, die häufig borkige knollige Auftreibungen an Schwanz und Extremitäten hervorrufen und so das Bild der chronischen Mäusepocken vortäuschen können. Daneben kommen bakterielle Septikämien und andere Viruserkrankungen in Frage (31).

2.4.6 Bekämpfung und Kontrollmaßnahmen

Das sicherste und auf die Dauer rationellste Verfahren zur Bekämpfung der Mäusepocken ist die Ausmerzung aller kranken Mäuse, einschließlich der Tiere eines Bestandes, die der Seuche und Ansteckung verdächtig sind. Nach Desinfektion der Stallungen etc. kann mit dem Aufbau einer neuen Zucht aus spezifisch pathogenfreien Tieren in Isolierstallungen begonnen werden. Dabei sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen (Gefahr einer Viruseinschleppung) zu beachten (31). Bei den heutigen Anforderungen, die man an Versuchstiere stellt, kann man der an sich bewährten Methode, infizierte Zuchten von der Außenwelt zu isolieren und die Nachzucht sofort zu vakzinieren (68), nicht mehr zustimmen. Auch Versuche, den Verlauf einer Ektromelieinfektion durch Chemotherapeutika zu beeinflussen, verliefen negativ. Kupfer- und Rhodanverbindungen sowie Isatin-Beta-Thiosemicarbazon-Präparate zeigten keine Wirkung (3, 4).

Zur Prophylaxe hat sich für bestimmte Mäusezuchten die Schutzimpfung mit Vacciniavirus durchgesetzt (siehe Abschnitt 3). Will man eine derartige Schutzimpfung bei seinen Tieren nicht anwenden, so empfiehlt sich, in bestimmten Abständen Stichproben gesund erscheinender Tiere auf Ektromelie untersuchen zu lassen. Neben der Erregerisolierung eignet sich zum Nachweis inapparenter Infektionen besonders die Agargel-Präzipitation (Vergleiche auch Abschnitt Diagnose). Sie zeigt sowohl die Aufnahme nur kleiner Dosen des Ektromelievirus an als auch eine Infektion bei Mäusestämmen mit genetisch fixierter Resistenz (38).

3. Die Schutzimpfung gegen Mäusepocken, Impfmethoden und -stoffe

Frühzeitig ging man dazu über, Mäusepopulationen durch prophylaktische Schutzimpfungen gegen die "Infektiöse Ektromelie" zu immunisieren. Als Impfstoff bot sich aufgrund seiner engen antigenen Verwandtschaft mit dem Ektromelievirus das Vacciniavirus an. Die nach einer Vacciniavirus-Infektion der Maus ausgelösten Immunisierungsvorgänge gewährleisteten einen Schutz vor einer Mäusepockeninfektion (8, 9, 18, 68, 71, 72). Es hat sich allerdings gezeigt, daß dieser geringer ist als der nach überstandener Ektromelievirus-Infektion (22). Auch im Ausmaß der Bildung komplexbindender und hämagglutinationshemmender Antikörper, sowie im Kreuzimmunitätstest wirksamer Antikörper kommt dies zum Ausdruck. Ihre Titer sind nach heterologer Infektion bedeutend niedriger als nach homologer (14).

Die ersten verwendeten Impfstoffe waren Pockenschutzlymphe vom Schaf (63) und Rind (56). In neuerer Zeit verwendet man bevorzugt Brutei-Chorioallantoismembran- oder Gewebekulturimpfstoffe (71, 72).

Als Impfmodus kommt in Anlehnung an die beim Menschen geübte Impfprophylaxe gegen die Pocken, die kutane Applikation des Impfstoffes am Schwanz der Maus in Frage. Auch die intranasale Instillation des Impfstoffes soll guten Erfolg haben, besonders dann, wenn die Dosis so gewählt wird, daß hämagglutinationshemmende Antikörper gebildet werden (23). Im Gegensatz hierzu ist BRIODY (8) der Auffassung, man müsse einen Vacciniavirus-Stamm verwenden, der keine derartigen Antikörper induziert, da sonst keine Möglichkeit bestünde, in der geimpften Population serologisch das Auftreten von Mäusepocken festzustellen. Er empfiehlt deshalb die Impfung mit dem Vacciniavirus-Stamm IHD-E, dem das Hämagglutinin fehlt.

Auch die intravenöse (9) und intraperitoneale (8, 19, 25)

Applikation des Vaccinia-Impfstoffes ruft eine gute Immunität hervor. Besonders letztere Methode hat sich nach ZELLER und RECKZEH (71, 72) wegen ihrer gegenüber anderen Methoden schnelleren Durchführbarkeit gut zur Impfung größerer Kollektive bewährt. Hierbei erwies sich das verwendete Bruteivirus (Vacciniavirus-Stamm "Ankara") einer käuflichen Pockenlymphe und einer im Handel befindlichen Gewebekulturvakzine (Vacciniavirus-Stamm "Bern") in der antigenen Wirkung gleichwertig. Derzeit wird letztere über infizierte, embryonale Rindermuskelzellen hergestellt (54).

Der Impfschutz erstreckt sich nach Vakzination mit dem Vacciniavirus über 6 - 9 Monate (62).

Eine Wiederimpfung bewirkt eine Wiederauffrischung der Immunität, trotzdem sinkt, selbst nach mehrmaligen Revakzinationen der Impfschutz jedes Mal innerhalb weniger Monate wieder ab (63, 71, 72).

Die von KONOSH (44) empfohlene dreimalige, subkutane Impfung mit einer formalininaktivierten, homologen Vakzine hat sich nicht durchgesetzt.

4. Die orale Immunisierung

4.1 Grundlagen

Die Befunde von HERBST (30), nach denen Partikel bestimmter Größe die Darmwand durchdringen können und nach kurzer Zeit in Blut und Lymphe nachweisbar sind, und die grundlegenden Arbeiten von VOLKHEIMER et al. (69, 70) erbrachten neue Gesichtspunkte über die orale Infektion und zur oralen Immunisierung.

Danach besteht die prinzipielle Möglichkeit, daß Partikel in der Größe von Viren und Bakterien sehr schnell die Schleimhaut des Verdauungstraktes durchdringen und, wenn sie infektiös sind, eine Infektion auslösen können. Mit

den Bedingungen einer oralen Immunisierung hat sich in den letzten Jahren vor allem die Arbeitsgruppe um RAETTIG (59) befaßt. Eine umfassende Zusammenstellung der einschlägigen Literatur stammt von BREUEL (7).

Faßt man die bisherigen Erkenntnisse zusammen, so ist eine erfolgreiche orale Immunisierung gegen nicht ausgesprochen enterotrope bakterielle und virale Erreger prinzipiell an folgende Voraussetzungen gebunden: Der oral bzw. peroral verabreichte Impfstoff muß in antigen wirksamer Form resorbiert werden, das heißt, er darf auf seinem Wege zur Dünndarmschleimhaut als dem Ort der größten Resorption nicht so geschädigt werden, daß er seine Immunogenität verliert. Es gilt vor allem die Einwirkung von Magensaft zu umgehen bzw. zu vermindern, weil dessen Azidität innerhalb weniger Minuten bestimmte Antigene und Virusarten irreversibel schädigt. So wird zum Beispiel Vacciniavirus nach 10 Minuten zum größten Teil inaktiviert, während der schwach alkalische Duodenalsaft das Virus, dessen pH-Optimum bei pH 7,2 liegt, nicht schädigt (41).

Um eine gute Immunisierung zu erreichen ist es anscheinend ferner notwendig, hohe Antigendosen, zum Teil sogar mehrmals, zu applizieren. Bei allen diesbezüglichen Versuchen hat sich gezeigt, daß die Menge der resorbierten und im Blut nachweisbaren Partikel bedeutend geringer ist als die ursprünglich enteral verabreichte.

Eine weitere Prämisse für die Anwendbarkeit oraler Impfstoffe ist, daß das Antigen oder der verwendete Erreger nicht die Schleimhaut des Magen-Darm-Kanals am Orte seiner Resorption schädigt. Einschlägige Versuche haben jedoch geklärt, daß der Resorptionsmechanismus unabhängig von der Pathogenität eines Erregers ist. Es muß also im Darm keine primäre Vermehrung des Erregers stattfinden (34, 59).

Bemühungen, eine Schädigung des Immunogens auf seinem Wege zur Persorption zu verhindern oder eine bessere Resorptionsrate und erhöhte Immunisierungswirkung zu erzielen, verliefen wenig befriedigend. So wurde erfolglos versucht, durch Voraussgabe von säureneutralisierenden Verbindungen und Gallepräparaten die Passage durch den Magen zu sichern und die Resorption im Dünndarm zu erhöhen. Ein Zusatz von Tardolyt zur Erhöhung der Phagozytoserate (58) konnte ebenso wenig wie Dimethylsulfoxyd (66), das die Durchlässigkeit der Gewebe steigert, die Resorption eines oral verabreichten Antigens im Darm verbessern.

Trotz der prinzipiellen Schwierigkeiten, die der Anwendung oraler bakterieller und viraler Impfstoffe entgegenstehen, konnten wirksame Schluckvakzinen gegen wichtige Infektionen des Menschen und der Tiere entwickelt werden, z.B. der Polio-Impfstoff nach SABIN, der Schluckimpfstoff gegen Typhus und Paratyphus und die Trinkwasservakzine gegen Newcastle Disease.

4.2 Die orale Immunisierung gegen Pockenvirusinfektionen

Die ersten systematischen Untersuchungen zur Möglichkeit einer oralen Immunisierung mit Vacciniavirus unternahm wohl 1909 CASAGRANDE (11). Anscheinend gelang es ihm, bei Hunden durch hohe, perorale Dosen von Vacciniavirus wenigstens eine Teilimmunität zu erzeugen. ANTOINE und WAGEMANS (1) versuchten 1927 Kaninchen mit Vacciniavirus oral zu immunisieren. Bei ihren Versuchen erwiesen sich nur die Tiere als immun, die den Erreger wenigstens zum größten Teil durch die Mundschleimhaut aufgenommen hatten. Kaninchen, denen das Impfvirus in den Magen eingebracht worden war, reagierten wie unbehandelte Kontrollen. Im Gegensatz dazu waren einige der Tiere immun, die den Impfstoff in

keratinisierten Kapseln erhalten hatten.

Erst in neuester Zeit wurde das Problem der oralen Immunisierung gegen Pockenvirusinfektionen wieder aufgegriffen. So berichteten 1969 HOCHSTEIN-MINTZEL et al. (34), daß oral verabreichter Dermoiimpfstoff vom Rind (Vacciniavirus-Stamm "Bern") bei Mäusen und Kaninchen zu einer serologisch nachweisbaren Immunreaktion führt, die sich beim Kaninchen auch durch die Modifikation der kutanen Nachimpfung zeigt. Vacciniavirusbedingte Veränderungen im Magen-Darm-Trakt von Mäusen und Meerschweinchen konnten die Autoren nicht beobachten.

Die Arbeitsgruppe um MAYR (13, 50, 51) beschritt neue Wege, als sie mit einem künstlich attenuierten Hühnerpockenvirus-Stamm Küken per os gegen Hühnerpocken immunisierte. Die Autoren erzielten bei genügend hoher Dosierung eine belastbare Immunität, die der nach einer kutanen Impfung nahekam. Das Neue an diesen Versuchen war, daß erstmals eine wirksame orale Immunisierung mit einem attenuierten Pockenvirus gegen eine Infektion mit dem homologen, eine zyklische Viruskrankheit auslösenden Erreger demonstriert wurde. Zum anderen konnten die Autoren eventuelle Schädigungen des oberen Verdauungs- und Respirationstraktes durch die Anwendung eines apathogenen, attenuierten Impfvirus vermeiden. Von oral verabreichtem, nicht attenuiertem Vacciniavirus ist bekannt, daß es bei bestimmten Bedingungen zu spezifischen Veränderungen in diesen Regionen führen kann.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Zellkulturen

Zur Virusanzüchtung und -vermehrung sowie für Titrationsen wurden ausschließlich Hühnerembryofibroblastenkulturen (FHE) verwendet. Wir stellten sie in enger Anlehnung an die von DULBECCO (16) beschriebene Technik her. Zehn Tage alte Hühnerembryonen wurden nach Entfernung von Augen und Extremitäten mittels einer 50 ml Record-Spritze mit Veterinärkonus in einen Erlenmeyer-Kolben gepreßt und dort mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS nach DULBECCO) 3mal gewaschen. Die Gewebsfragmente sedimentierten innerhalb weniger Minuten, der aus Zelldetritus und Erythrozyten bestehende Überstand wurde verworfen. Um eine zu starke Verdünnung der Trypsinierungsflüssigkeit zu vermeiden, erfolgte ein abschließendes Waschen des Gewebes mit PBST im Sinne einer Vortrypsinierung (0,25 % Trypsin in PBS, 10 Minuten). Danach versetzten wir das Gewebe erneut mit PBST im Verhältnis 1: 20 und trypsinisierten es auf dem Magnetrührer 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Die durch mehrere Lagen Mull filtrierte Zellsuspension zentrifugierten wir 20 Minuten bei 1000 U/min. und nahmen das Zellsediment in Lactalbumin-Yeast-Medium mit 10 % Kälberserum, Antibiotika und Phenolrot in üblichen Mengen auf. Die Zellzahl wurde stets auf 500 000/ml eingestellt. In LEIGHTON-Röhrchen (Fa. BELLCO) füllten wir 2 ml, in Vierkant-Kolben 20 ml und in Roux-Schalen 100 ml Zellsuspension ein. Nach viertägiger Bebrütung bei 37°C hatte sich in der Regel ein einschichtiger Zellrasen ausgebildet.

2. Virusstämme

Zur Immunisierung verwendeten wir folgende Vacciniavirus-Stämme:

A. Vacciniavirus-Stamm CVA "Ankara". Er lag als attenuiertes Kulturvirus der 532. Passage in FHE-Zellen vor.⁺

B. Vacciniavirus-Stamm CVB "Bern". Hierbei handelt es sich um einen institutseigenen, an embryonale Rindermuskelzellen adaptierten, jedoch noch nicht attenuierten Virusstamm. Er wird als Impfstoff für die Immunisierung von Mäusen gegen Ektromelie abgegeben, seine Unschädlichkeit und Wirksamkeit sind erwiesen.

Für sämtliche Testinfektionen gelangte der eiadaptierte, virulente Ektromelievirus-Stamm "Düsseldorf" E2⁺ nach seiner Vermehrung in FHE-Kulturen zur Anwendung.

3. Viruszüchtung

A. Stamm CVA: Die Anzüchtung erfolgte in Vierkant-Kolben. Nach einer Adsorptionszeit von 3 Stunden bei 37°C wurde nicht adsorbiertes Virus durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt und Rinderamnionflüssigkeit (RAF) als Erhaltungsmedium zugegeben. Der bei den Passagen Nr. 533 bis 544 aufgetretene zytopathische Effekt (zpE) entsprach den Beobachtungen von MAYR und MUNZ (48), er setzte etwa am 2. Tag p.i. ein und zeigte sich als herdförmige Quellung und Abrundung sowie teilweise Schrumpfung der Zellen. Eine totale Lysis der so veränderten Zellen setzte erst am 5. Tag p.i. ein. Um genügend Impfmateriel zu ge-

+ Für die Überlassung dieser Virusstämme danken wir dem Vorstand des Institutes für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Ludwig-Maximilians-Universität München Herrn Prof. Dr. Dr.hc. A. MAYR.

winnen, verwendeten wir das in Roux-Schalen gezüchtete Virus der 541.- 544. FHE-Passage. Wir ernteten das Virus, noch ehe es zu einer totalen Lysis und Ablösung des Zellrasens von der Glaswand kam (etwa 4. Tag p.i.) und froren es bei -20°C ein.

Zur Freisetzung von zellgebundenem Virus wurden die Passagendreimal eingefroren und wieder aufgetaut, vereinigt, eine Minute mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax der Fa. JANKE und KUNKEL) im Eisbad behandelt und kurz bei 3000 U/min. abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände dienten als Impfstoff.

B. Der Stamm CVB konnte in genügender Menge vom Institut für Vergleichende Tropenmedizin der Universität München bereitgestellt werden.

C. Die uns überlassene mit Ektromelievirus infizierte Chorioallantoismembran (CAM) homogenisierten wir 1:5 mit RAF, zentrifugierten die Suspension scharf ab und verimpften je 1 ml des 1:10 und 1:100 verdünnten Überstandes auf FHE-Kulturen in Vierkant-Kolben.

Es entwickelte sich ein spezifischer zpE, dessen zeitliches Auftreten und Intensität von der Animpfdosis abhing. Bei der in den Tier-Versuchen verwendeten 2. Passage waren die Zellen am 4. Tag p.i. weitgehend verändert. Es kam zu Abrundung, Schwellung und starker Granulierung der Zellen, die sich noch nicht von der Glaswand abgelöst hatten. Bei Titrationen konnten wir das Auftreten von Plaques in Abhängigkeit von der Viruskonzentration beobachten.

Die Kulturen wurden am 4. Tag p.i. bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut, abzentrifugiert und das virushaltige Medium in Portionen zu 5 ml abgefüllt. Diese lagerten bis zu ihrer Verwendung bei -20°C .

4. Titrierungen

Der Virusgehalt der Impfstoffe und des zur Testinfektion verwendeten Ektromelievirus wurde auf FHE-Kulturen in LEIGHTON-Röhrchen bestimmt: Ansatz der Verdünnungen in Zehnerpotenzen unter Verwendung von RAF als Verdünnungsmedium, Verimpfung von je 1 ml Virusverdünnung auf 4 Teströhrchen pro Verdünnung. Dazu gaben wir jeweils 1 ml ErhaltungsmEDIUM. Wir kontrollierten täglich den zpE bis zur Endablesung am 7. Tag. Seine Spezifität sicherten wir dabei nach Entfernung des Mediums durch Zugabe von 1 ml einer 0,5 %igen Erythrozytensuspension weißer Leghornhühner (Hämadsorptionsmethode nach BONITZ) (6). Die Titerbestimmung erfolgte durch Berechnung der 50%igen Kulturinfektiosen-Dosis (KID_{50}) nach KÄRBER (42).

Der Titer des zur Impfung verwendeten Vacciniavirus-Stammes CVA betrug $10^{7,5} KID_{50}/ml$, der des Stammes CVB (Charge Nr. 971) $10^{6,75} KID_{50}/ml$ und der des Ektromelievirusstammes "Düsseldorf" (2. FHE-Passage) $10^{4,5} KID_{50}/ml$. Dessen 50 %ige letale Dosis (LD_{50}) bestimmten wir durch intraperitoneale Verimpfung an Mäusen. Sie betrug $10^{4,5} LD_{50}/0,2 ml$.

5. Tiermaterial, Haltungs- und Versuchsbedingungen

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche weiße, spezifisch pathogenfreie Mäuse (Stamm Ha/ICR Swiss) der Fa. MUS-RATTUS A.G., Brunnthal bei München. Sie wurden im Alter von ca. 3 Wochen und bei einem Gewicht von 12 - 16 gr. angekauft. Ihre Fütterung erfolgte mit pelletiertem Futter (Fa. ALTROMIN, Lage/Lippe) ad libitum. Wir setzten jeweils 10 gleichgeschlechtliche Tiere in Makrolonkäfige (Größe III). Immunisierte Tiere und nicht geimpfte Kontrollen waren bis zum Belastungsversuch räumlich getrennt. Letzteren führten wir bei allen Mäusen in einem Isolier-

stall mit Schleuseneinrichtung für Personal und Material durch. Die Mäuse wurden vor Versuchsbeginn 1 - 2 Wochen beobachtet und Serumpools auf das Freisein von orthopox-viruspezifischen, hämagglutinationshemmenden Antikörpern untersucht.

Die Immunisierungsversuche wurden an 777 Tieren durchgeführt. Während der Beobachtungszeit prüften wir den normalen Wasserverbrauch des Einzeltieres und den von Gruppen bei Futterangebot, wie auch nach bestimmten Hunger- und Dürstperioden sowie den pH-Wert des Mageninhaltes einzelner, gesunder Tiere.

6. Prüfung der Impfstoffe auf ihre Verwendbarkeit als Trinkvakzine

Ziel dieser Vorversuche war, zu untersuchen, ob bei Stalltemperatur und unter Verwendung von Leitungswasser als Verdünnungsmittel für den Impfstoff mit einem nicht vertretbarem Titerabfall innerhalb einer bestimmten Zeit zu rechnen ist. Wir testeten die Impfstoffe bei einer Umgebungstemperatur von $+22^{\circ}\text{C}$ und zur Sicherheit auch bei $+37^{\circ}\text{C}$ konzentriert und in verschiedenen, mit abgekochtem Leitungswasser angesetzten Verdünnungen.

7. Immunisierungsmethoden

Die parenteralen Vakzinationen wurden wie üblich durchgeführt. Bei der Applikation des Impfstoffes mit einer Sonde in den Magen der Maus gingen wir wie folgt vor: Die auf eine Recordspritze aufgesetzte Knopfkanüle (70 x 1,5 mm) wurde der fixierten Maus durch Maul, Schlund und Speiseröhre in den Magen vorgeschoben, erst dann erfolgte die Verabreichung der Impfstoffmenge. Eine vorherige Narkose

der Tiere war nicht notwendig. Bei richtigem Sitz der Kanüle im Magen ließ sich der Impfstoff ohne besonderen Druck leicht applizieren. Dies war vor allem dann der Fall, wenn der Kopf der Maus maximal gestreckt war. Nur selten gelangte Impfstoff auch in die Trachea. Dies äußerte sich durch Störung der Atemtätigkeit und Ausfluß des Impfstoffes aus der Nase. Mäuse mit falsch applizierter Vakzine wurden aus den Versuchen ausgeschlossen.

Die Trinkvakzinen wurden in der Regel in Tränkflaschen angeboten, so daß pro Tier eine Impfstoffmenge von 10 ml der entsprechenden Konzentration zur Verfügung stand. Um eine eventuelle unterschiedlich große Impfstoffaufnahme bei Verwendung nur einer Trinkmöglichkeit für 10 Tiere auszuschließen, setzten wir einigen Gruppen die Vakzine auch in kleinen Petrischalen vor.

In einem Vorversuch immunisierten wir 164 Mäuse in Gruppen von maximal 8 Tieren mit Vacciniavirus CVA auf die verschiedenste Weise, um die Verträglichkeit und Unschädlichkeit des Impfstoffes zu testen. Gleichzeitig sollten Richtwerte für spätere Hauptversuche über die einmalige bzw. zweimalige gleichartige Vakzination erzielt werden. Die Aufsplitterung in relativ kleine Gruppen war ferner dadurch bedingt, daß schon im Vorversuch Anhaltspunkte für eine unterschiedliche Immunisierbarkeit und Empfänglichkeit gegenüber einer Testinfektion der Geschlechter gewonnen werden sollten (Vgl. Tabelle 1).

Im 1. Hauptversuch immunisierten wir insgesamt 397 Tiere auf folgende Weise: Ein Teil der Tiere erhielt dreimal in Abständen von 3 Tagen, der andere dreimal in Abständen von 7 Tagen das Impfvirus. Die weitere Untergruppierung ergab sich dadurch, daß von jeder dieser beiden Grup-

pen jeweils die Hälfte mit Vacciniavirus CVA bzw. CVB so immunisiert wurde, daß jeweils 20 Mäusen das Impfvirus intraperitoneal, 40 per Sonde und 40 als Trinkvaccine verabreicht wurde. Eine letzte Untergruppierung ergab sich nach dem Geschlecht. Im Gegensatz zum Vorversuch wurde die Trinkvaccine nur 1:10 verdünnt angeboten. Tabelle 2 gibt einen Überblick über dieses Immunisierungsschema.

Im 2. Hauptversuch der aus Gruppen zu 10 - 40 Mäusen aufgebaut war und insgesamt 216 Tiere umfaßte, ließen wir, um eine optimale Resorption der oral applizierten Vaccine zu gewährleisten, die Tiere eine Nacht dürsten, zum Teil auch hungern und dürsten. Der Impfstoff wurde 1:10 verdünnt in Tränkflaschen, in konzentrierter Form in Petrischalen und zur Aufnahme ad libitum auch in Tränkflaschen angeboten. Als Kontrollen vakzinierten wir einige Gruppen i.p. und mit der Sonde.

Als Impfstoff kam ausschließlich der Vacciniavirus-Stamm CVA zur Anwendung. Einen Überblick gibt Tabelle 3.

8. Belastungsversuch mit virulentem Ektromelievirus

Zur Prüfung der erzielten Immunität wurden alle immunisierten Mäuse einer intraperitonealen Testinfektion zu bestimmten Zeiten p.vacc. mit virulentem Ektromelievirus unterworfen. Die verabfolgte Dosis betrug $10^{2,5} \text{LD}_{50}$ in 0,2 ml. Die Mäuse des Vorversuches wurden 106 Tage nach der ersten Immunisierung bzw. 35 Tage nach der zweiten (= 106 Tage nach der ersten) infiziert. Im 1. Hauptversuch erfolgte die Infektion 14 Tage, im 2. Hauptversuch 20 Tage nach der letzten Impfung. Der Verlauf der Infektion wurde täglich überprüft. Die Wirkung dieser Testinfektion wurde jeweils bei nicht vorgeimpften und gleichaltrigen Tieren vergleichend überprüft. Diese Kontrollen erhielten die gleiche Virusdosis.

Tabelle 1: Impf- und Infektionsplan der im Vorversuch 1mal bzw. 2mal vakzinierten Mäuse.

Impfstoff: Vaccinia-Virus CVA der 541. - 544.

Passage in FHE-Zellen, Titer: $10^{7,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$

Immunisierungsschema				Testinfektion	
Zahl u. Geschl. d.Tiere	Vakzin. im Alter v.	Revakzin. Tage n. 1. Vakzin.	Dosis / Tier und Applik.modus	Zeitpunkt Tage n. ltz.Vakzin.	Dosis/Tier
4 m 3 w 5 m 5 w 3 m 5 w	5 Wo.	- - - - - -	0,01ml konz.i.c. 0,5 ml konz.i.p. 0,5 ml konz.i.m. 0,5 ml konz.i.v. 0,5 ml konz.s.c. konz. skarif.	106 Tage	0,2 ml E i.p. ($10^{2,5} \text{LD}_{50}/0,2\text{ml}$)
7 m 6 w 5 m 7 w 7 m 5 w 6 m 5 w 5 m 7 w 6 m 4 w	5 Wo.	- - - - - - - - - - - -	0,5 ml konz.m.S. 0,5 ml konz.m.S. 1,0 ml konz.m.S. 1,0 ml konz.m.S. 1,0 ml 1:10 m.S. 1,0 ml 1:10 m.S. 1,0 ml 1:100m.S. 1,0 ml 1:100m.S. Tränke 1:10 Tränke 1:10 Tränke 1:100 Tränke 1:100	106 Tage	0,2 ml E i.p. ($10^{2,5} \text{LD}_{50}/0,2\text{ml}$)
6 m 6 w 2 m 7 w 8 m 5 w 5 m 5 w 6 m 8 w 5 m 6 w	5 Wo.	71 Tg.	0,5 ml konz.m.S. 0,5 ml konz.m.S. 1,0 ml konz.m.S. 1,0 ml konz.m.S. 1,0 ml 1:10 m.S. 1,0 ml 1:10 m.S. 1,0 ml 1:100m.S. 1,0 ml 1:100m.S. Tränke 1:10 Tränke 1:10 Tränke 1:100 Tränke 1:100	35 Tage	0,2 ml E i.p. ($10^{2,5} \text{LD}_{50}/0,2\text{ml}$)
13 w 6 m	- -	- -	Kontrollen Kontrollen	im Alter v. 20 Wochen	0,2 ml E i.p. ($10^{2,5} \text{LD}_{50}/0,2\text{ml}$)

Zeichenerklärung zu Tabelle 1 siehe Seite 30 a.

Zeichenerklärung zu Tabelle 1 (gilt auch für alle übrigen Tabellen):

m = männlich; w = weiblich; Vakzin. = Vakzination; Revakzin. = Revakzination; konz. = konzentriert; i.c. = intracerebral; i.p. = intraperitoneal; i.m. = intramuskulär; i.v. = intravenös; s.c. = subkutan; skarif. = skarifiziert; m.S. = mit Sonde; Tränke = 100 ml/ Impfstoff (1:10 oder 1:100 verdünnt) in Tränkflaschen für jeweils 10 Mäuse; E = Ektromelievirus, Stamm "Düsseldorf" E 2.

Tabelle 2: Impf- und Infektionsplan der im 1. Hauptversuch dreimal in 3- bzw. 7-tägigem Abstand vakzinierten Mäuse. Impfstoff A = Vaccinia-Virus CVA der 541.-544. Passage in FHE-Zellen, Titer: $10^{7,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$; Impfstoff B = Vaccinia-Virus CVB, Charge Nr. 971, Titer: $10^{6,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$.

Immunisierungsschema			Testinfektion							
Zahl u. Geschl. d.Tiere	Vakzin. im Alter v.	Impfstoffdosis/Tier u. Applik.modus	Zeitpunkt Tage n. ltz.Vakzin.	Dosis/Tier						
3malige Vakzination in Abständen von 3 Tagen										
10 m 10 w 21 m 20 w 19 m 20 w	4 Wo.	0,1 ml A konz. i.p. 0,1 ml A konz. i.p. 1,0 ml A konz. m.S. 1,0 ml A konz. m.S. Tränke A 1:10 Tränke A 1:10	14 Tage	0,2 ml E i.p. (10 ^{2,5} LD ₅₀ /0,2 ml)						
10 m 10 w 19 m 19 w 20 m 20 w		0,1 ml B konz. i.p. 0,1 ml B konz. i.p. 1,0 ml B konz. m.S. 1,0 ml B.konz. m.S. Tränke B 1:10 Tränke B 1:10								
3malige Vakzination in Abständen von 7 Tagen										
10 m 10 w 20 m 20 w 19 m 20 w		4 Wo.			0,1 ml A konz. i.p. 0,1 ml A konz. i.p. 1,0 ml A konz. m.S. 1,0 ml A konz. m.S. Tränke A 1:10 Tränke A 1:10	14 Tage	0,2 ml E i.p. (10 ^{2,5} LD ₅₀ /0,2 ml)			
10 m 10 w 20 m 20 w 20 m 20 w					0,1 ml B konz. i.p. 0,1 ml B konz. i.p. 1,0 ml B konz. m.S. 1,0 ml B konz. m.S. Tränke B 1:10 Tränke B 1:10					
20 m 20 w					- -			Kontrollen Kontrollen	im Alt.v. 7-9 Wo.	0,2 ml E i.p. (10 ^{2,5} LD ₅₀ /0,2 ml)

Tabelle 3: Impf- und Infektionsplan der im 2. Hauptver-
such 3 mal in 3-tägigem Abstand vakzinierten
Mäuse. Impfstoff: Vaccinia-Virus CVA der 541.
-544. Passage in FHE-Zellen, Titer $10^{7,5}$ KID₅₀/ml.

Zahl u. Geschl. d. Tiere	Immunisierungsschema		Testinfektion	
	1. Vakzin. im Alter v.	Dosis/Tier und Applik. modus	Zeitpunkt Tage n. ltz. Vakzin.	Dosis/Tier
19 w 18 w 39 w 37 w 5 m 39 w 40 w 7 m 9 w 3 m	4 Wo.	0,1 ml konz. i.p. 1,0 ml konz. m.S. Tränke 1:10 n.D. Tränke 1:10 n.H.u.D. Tränke 1:10 n.H.u.D. Tränke m.P.konz.n.D. Tränke m.P.konz.n.H.u.D. Tränke m.P.konz.n.H.u.D. Tränke m.F.konz.n.H.u.D. Tränke m.F.konz.n.H.u.D.	20 Tage	0,2 ml E i.p. ($10^{2,5}$ LD ₅₀ /0,2ml)
20 w	-	Kontrollen	im Alt.v. 7 Wo.	0,2 ml E i.p. ($10^{2,5}$ LD ₅₀ /0,2ml)

Zeichenerklärung: n.D. = nach einer Nacht dürsten; n.H.u.D. =
nach einer Nacht hungern und dürsten; m.P. = Impfstoff in
Petrischale als Tränke angeboten, pro Maus 1 ml; m.F. =
Impfstoff in Tränkflaschen zur Aufnahme ad libitum angeboten.

9. Prüfung auf pathologische Veränderungen

Zur Überprüfung der Verträglichkeit der per os verabreichten Impfstoffe wurden 10 Mäuse des Vorversuches 1 Woche p.vacc. getötet und auf makroskopisch erkennbare Veränderungen untersucht. In gleicher Weise verfahren wir bei Tieren, die nach der Testinfektion verendet waren, äußerlich aber keine typischen Ektromeliesymptome zeigten.

10. Serumgewinnung

Blut zum Nachweis hämagglutinationshemmender Antikörper gewannen wir nach der von NÖLLER (55) angegebenen Methode aus dem Retroorbitalplexus mit Äther narkotisierter Mäuse. Hierzu wurde das Blut von maximal 5 Mäusen gepoolt. Die gewonnenen Seren lagerten wir bis zur Auswertung bei -20°C .

11. Hämagglutinationshemmungs (HAH)-Test

Zur serologischen Feststellung von Antikörpern gegen Orthopoxviren wählten wir den HAH-Test. Wir benutzten die von MAYR (46) beschriebene Technik.

Bei einem Teil der Tiere des Vorversuches testeten wir das Serum zum ersten Mal 10 Tage p.vacc., bei einem anderen Teil 24 Tage p.vacc. Das Serum aller Tiere wurde schließlich 81 Tage nach der ersten bzw. 10 Tage nach der zweiten Immunisierung untersucht.

Im 1. Hauptversuch prüften wir Serum, das 14 Tage, im 2. Hauptversuch Serum, das 20 Tage nach der letzten Impfung gewonnen wurde. Darüberhinaus untersuchten wir im 1. Hauptversuch bei überlebenden Tieren nach der Testinfektion, ob es zu einem zusätzlichen Titeranstieg gekommen war.

Bei der Durchführung des HAH-Testes gingen wir wie folgt vor:

An Gebrauchslösungen wurden benötigt:

1. 0,85 %ige, phosphatgepufferte NaCl-Lösung, pH 7,2
2. 0,5 %ige und 1 %ige Hühnererythrozyten-Suspension
(Es wurde dreimal gewaschenes Zitratblut weißer Leghornhennen verarbeitet, zum Waschen diente obige NaCl-Lösung)
3. Vacciniavirus-Antigen (Gewebekulturantigen), auf 4 hämagglutinierende Einheiten eingestellt, bei 56°C 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert.

Die Inaktivierung der zu untersuchenden Seren (jeweils 0,3 ml) erfolgte in der Verdünnung 1:2 in 0,3 ml 0,85 %iger NaCl-Lösung. Jeweils 0,3 ml dieser Serumverdünnung - die verbleibenden 0,3 ml dienten später als Serum-Kontrolle - wurden zunächst in 0,3 ml 1 %ige Hühnererythrozyten-Suspension übergeführt und gemischt. Die weitere Verdünnung in Zweierpotenzen geschah in jeweils 0,3 ml 0,5 %iger Hühnererythrozyten-Suspension. Aus der Verdünnung 1:512 wurden 0,3 ml verworfen. Nach Zugabe von je 0,3 ml Antigengebrauchsverdünnung, gründlichem Mischen, Stehenlassen von jeweils 1 Stunde im Wasserbad bei 37°C und bei Zimmertemperatur konnte die Reaktion abgelesen werden.

Stets liefen eine Serumkontrolle zur Prüfung der Eigenagglutination, eine NaCl-, eine Antigen-Kontrolle, ein negatives Serum und ein Vaccinia-Immunserum mit bekanntem Titer parallel.

Zur Ablesung wurden die Röhrchenständer schräggehalten und, nach Auslaufen der NaCl-Kontrolle, wie folgt beurteilt:

negativ	zungenförmiges Auslaufen aus der Röhren- kuppe
+	knopfförmiges Sediment
++	Sediment gleichmäßig oder gekörnt mit un- regelmäßigem Rand
+++	Sediment gleichmäßig oder gekörnt, die ge- samte Röhrenkuppe einnehmend

II. Versuche und Ergebnisse

1. Versuche zur oralen Aufnahme von Virussuspensionen

Nach den Angaben der Literatur hängt eine erfolgreiche orale Immunisierung weitgehend von der Menge des aufgenommenen Antigens ab. Davon ausgehend versuchten wir mit nachfolgend beschriebenen Experimenten festzustellen, wieviel Flüssigkeit eine Maus pro Tag freiwillig zu sich nimmt. Diesbezügliche Angaben fanden wir in der Literatur nicht.

Je 5, in Makrolonkäfigen bei 22°C gehaltene Mäuse erhielten abgemessene Mengen Leitungswasser in Tränkflaschen angeboten. Der Wasserverbrauch wurde über eine Woche verfolgt und daraus der durchschnittliche Verbrauch pro Tier und Tag errechnet. Er belief sich für eine Maus von ca. 20 gr Körpergewicht bei Pelletfütterung auf 5,0 - 10,0 ml. Ein Unterschied in der Aufnahme unseres verwendeten Gewebekulturmediums gegenüber Leitungswasser war nicht festzustellen.

Wir boten deshalb bei den Immunisierungsversuchen 100 ml Impfstoff für jeweils 10 Mäuse in 250ccm-Flaschen an. Diese Mengen wurden stets in 24 - 36 Stunden ausgetrunken.

Eine weitere Vorbedingung für eine erfolgreiche orale Immunisierung ist, daß das Antigen in wirksamer Form aufgenommen wird. Für unsere Immunisierungsversuche bedeutete dies, den Einfluß von Zeit, Temperatur und Verdünnungsmittel auf das in Gewebekulturmedium suspendierte Virus zu überprüfen. Diese Faktoren testeten wir auf folgende Weise:

Impfstoff CVA ($10^{7,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$) wurde 1:10 und 1:100 mit abgekochtem Leitungswasser (pH 6,5) verdünnt und sofort, nach 7 und nach 24 Stunden Lagerung bei 22°C Proben zur Titration entnommen.

Ein wesentlicher Titerabfall war bis zur 7. Stunde nicht nachweisbar. Die nach 24-stündiger Lagerung entnommenen Proben zeigten einen Titerverlust von einem log 10 an (Vgl. Tabelle 4). Ein analoges Verhalten des Impfstoffes CVB war bekannt (54).

Tabelle 4: Infektiositätsverlust konzentrierter und mit Leitungswasser verdünnter Trinkwasservakzine (Impfvirus CVA) bei 22°C.

Zeit der Entnahme in Stunden	Titer (log 10 KID ₅₀) des Impfvirus CVA in der Trinkwasservakzine		
	konz.	Verd. 1:10	Verd. 1:100
0	8,0	7,0	6,0
7	8,0	6,5	6,0
24	7,0	6,0	5,0

2. Verträglichkeit der verabreichten Impfstoffe

Zur Unschädlichkeitsprüfung applizierten wir den zur Immunisierung verwendeten Vacciniavirus-Stamm CVA konzentriert und in verschiedenen Verdünnungen einer bestimmten Anzahl Mäusen (Vgl. I/7.).

Störungen des Allgemeinbefindens ließen sich weder nach intracerebraler, intraperitonealer, intramuskulärer, intravenöser und subkutaner Applikation noch nach Skarifikation feststellen. Auch mit der Sonde oder als Tränke verabreichter Impfstoff wurde reaktionslos vertragen. Pathologische Veränderungen konnten bei 7 Tage p.vacc. sezierten Mäusen nicht diagnostiziert werden, Auf das mögliche Auftreten von Pockenläsionen der Verdauungs- und Atemwege wurde besonders geachtet.

Die Unschädlichkeit des Impfstoffstammes CVB nach intraperitonealer und oraler Applikation war für Mäuse mit einem Mindestgewicht von 20 gr bekannt (54).

3. Untersuchungen zur Wirksamkeit einer oralen Immunisierung

3.1 Ergebnisse des Vorversuches

Um orientierende Hinweise für eine sich bildende humorale Immunität zu erhalten, untersuchten wir gepoolte Serumproben der verschiedenen Tiergruppen des Vorversuches zu bestimmten Zeiten p.vacc. Die einzelnen relevanten Daten bringt Tabelle 5.

Es zeigte sich, daß mit Ausnahme der subkutan und kutan geimpften Tiere, nach parenteraler Applikation bei allen Gruppen hämagglutinationshemmende Antikörper 21 Tage p.vacc. nachweisbar waren. Nur bei subkutan geimpften Tieren war auch nach 81 Tagen p.vacc. kein Hämagglutinationshemmungstiter festzustellen.

Die oral immunisierten Tiere ließen fast ausnahmslos bis zum 21. Tage nach der Vakzination keine serologische Antwort auf die Impfung erkennen. Nur bei den Gruppen, die mit der Sonde Impfvirus in konzentrierter Form einmal oder zweimal erhalten hatten, fanden sich niedrige Titer. Eine Serumkonversion ließ sich jedoch bei den meisten Tiergruppen am 81. Tag nach der 1. bzw. 10. Tag nach der 2. Impfung demonstrieren. Ein signifikanter Unterschied zwischen ein- und zweimal vakzinierten Tieren trat jedoch nicht auf.

Bei einem Vergleich der parenteral und oral immunisierten Gruppen fällt ferner auf, daß nach parenteraler Verabreichung des Virus im allgemeinen höhere Titer resultierten als nach oraler Applikation.

Die Testinfektion sämtlicher Mäuse 106 Tage nach der 1. bzw. 35 Tage nach der 2. Immunisierung erbrachte folgendes Ergebnis (Vgl. Tabelle 6):

Mit Ausnahme der subkutan geimpften Tiere, die alle an akuter

Tabelle 5: Ergebnisse von HAH-Testen der im Vorversuch
1 x bzw. 2 x vakzinierten Mäuse (Abstand zur
Erstvakzinierung 71 Tage).

Geschl. Dosis/ Tier u. Applik.modus	1. HAH-Test Tage nach 1. Vakzin.	Titer 1:	2. HAH-Test Tage nach 1.bzw.2.Vakzin.	Titer 1:
m 1x 0,01ml konz.i.c.	21	4	81	64
w 1x 0,5 ml konz.i.p.	21	4	81	4
m 1x 0,5 ml konz.i.m.	21	8	81	32
w 1x 0,5 ml konz.i.v.	21	16	81	32
m 1x 0,5 ml konz.s.c.	21	Ø	81	Ø
w 1x konz.skarifiz.	21	Ø	81	8
m 1x 0,5 ml konz.m.S.	21	Ø	81	4
m 2x 0,5 ml konz.m.S.	21	Ø	10	4
w 1x 0,5 ml konz.m.S.	10	Ø	n.durchgeführt	
w 2x 0,5 ml konz.m.S.	10	Ø	10	8
m 1x 1,0 ml konz.m.S.	10	Ø	81	4
m 2x 1,0 ml konz.m.S.	10	Ø	n.durchgeführt	
w 1x 1,0 ml konz.m.S.	21	4	n.durchgeführt	
w 2x 1,0 ml konz.m.S.	21	4	10	4
m 1x 1,0 ml 1:10 m.S.	10	Ø	n. durchgeführt	
m 2x 1,0 ml 1:10 m.S.	10	Ø	10	16
w 1x 1,0 ml 1:10 m.S.	21	Ø	81	4
w 2x 1,0 ml 1:10 m.S.	21	Ø	10	16
m 1x 1,0 ml 1:100 m.S.	10	Ø	81	8
m 2x 1,0 ml 1:100 m.S.	10	Ø	10	4
w 1x 1,0 ml 1:100 m.S.	21	Ø	81	4
w 2x 1,0 ml 1:100 m.S.	21	Ø	10	4
m 1x Tränke 1:10	21	Ø	81	4
m 2x Tränke 1:10	21	Ø	10	Ø
w 1x Tränke 1:10	10	Ø	n.durchgeführt	
w 2x Tränke 1:10	10	Ø	n.durchgeführt	
m 1x Tränke 1:100	10	Ø	81	4
m 2x Tränke 1:100	10	Ø	10	4
w 1x Tränke 1:100	21	Ø	81	4
w 2x Tränke 1:100	21	Ø	n.durchgeführt	
m - Kontrollen	21	Ø	81	Ø
w - Kontrollen	21	Ø	81	Ø

Ektromelie verstarben, hatten alle parenteral vakzinieren einen guten Impfschutz. 86 % der Tiere überlebten die Infektion mit dem Ektromelievirus.

Die orale Immunisierung in diesem Versuch läßt - sicher auch mitbedingt durch die Aufsplitterung in zum Teil sehr kleine Tiergruppen - kein beweiskräftiges Bild über die Abhängigkeit der erzielten Immunität von verabreichter Impfstoffdosis und deren Applikationsart erkennen. Es ergaben sich jedoch Anhaltspunkte dafür, daß zweimal immunisierte Tiere einen besseren Schutz besaßen als einmal vakzinierter und höhere Virusdosen besser immunisieren als niedrigere. Auffallend ist ferner, daß zahlenmäßig mehr Weibchen die Testinfektion überstanden als vorbehandelte Männchen. Diese Aussage wird durch den Verlauf der Testinfektion bei den Kontrolltieren gestützt: Hier verstarben alle Tiere, unabhängig vom Geschlecht.

3.2 Ergebnisse des 1. Hauptversuches

Bei seiner Planung gingen wir von folgenden Überlegungen aus:

Nach den Ergebnissen des Vorversuches läßt sich durch orale Immunisierung eine gewisse Immunität erzielen. Da wir dabei das Zeitintervall sowohl zwischen Erstimpfung und Boosterung als auch zwischen Erstimpfung und Testinfektion relativ groß gewählt hatten, gingen wir im 1. Hauptversuch von der Vorstellung aus, daß eine in kurzen Abständen mehrmals durchgeführte Immunisierung bessere Ergebnisse bringen könnte. Ein weiterer, noch ungeklärter Faktor war, ob der attenuierte Impfstoffstamm CVA gegenüber dem nicht attenuierten Stamm CVB in seiner immunogenen Wirkung zu vergleichen ist. Bei der technischen Durchführung legten wir ferner das Gewicht auf die Vakzinierung über das Trinkwasser und weniger auf Tiergruppen, die i.p. und über die Sonde

immunisiert wurden. Schließlich sollte die im Vorversuch bemerkte unterschiedliche Empfänglichkeit der Geschlechter nochmals überprüft werden. Details der Versuchsanordnung sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 7 zeigt, daß die orale Immunisierung mit beiden Impfstoffen über das Trinkwasser sowohl bei dreimaliger Verabreichung in 3-tägigen Abständen als auch in 7-tägigen Abständen nicht mit der Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper beantwortet wurde.

Ein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Impfintervallen war nicht erkennbar. Nach intraperitonealer und Sonden-Impfung induzierte jedoch der Stamm CVB in beiden Vakzinationsgruppen höhere Antikörpertiter als der Stamm CVA, wobei weibliche Tiere stets eine bessere Antikörperbildung zeigten.

Die 14 Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführte Testinfektion ließ ein wesentlich einheitlicheres Bild erkennen als der Vorversuch. So zeigte die erzielte Immunität bei beiden, sich zeitlich unterscheidenden Impfverfahren eine eindeutige Abhängigkeit von der Applikationsmethode: Alle i.p. immunisierten Mäuse und fast sämtliche Tiere, die den Impfstoff über die Sonde erhalten hatten, waren unabhängig vom Geschlecht gegenüber der Testinfektion resistent. Unterschiede in der immunogenen Wirkung der beiden Impfstoffe traten nicht auf.

Die Aufnahme der Vakzine über das Trinkwasser bewirkte keine gute Immunität. Bei allen so vakzinierten Gruppen wurde ein wesentlich schlechterer Infektionsschutz erzielt als mit den beiden anderen getesteten Verfahren. Wiederum erlagen männliche Tiere (97,5 %) häufiger der Testinfektion als weibliche (80 %). Es ergaben sich keine Unterschiede in der Wirkung der beiden Impfstoffe und den Impfintervallen.

Tabelle 7: Hämagglutinationshemmung-Titer 14 Tage nach der letzten Vakzination und bei die i.p. Testinfektion überlebenden Tieren (n.T.); Verlauf und Ergebnis der i.p. Testinfektion mit 0,2 ml Ektromelievirus ($10^{2,5}LD_{50}$) im 1. Hauptversuch.

Zahl u. Geschl.d. Tiere Impfstoff;Dosis/ Tier u. Applik.modus	HAH - Titer 14 Tage p.vacc. n.T. 1: 1:		Tage p.inf. verendet 7 8 9 10 11 12 13 15										tot/ gesamt	Überleb. Rate in %
3malige Vakzination in Abständen von			3 Tagen											
10 m 0,1 ml A konz.i.p.	16	128											-/10	100
10 w 0,1 ml A konz.i.p.	16	64											-/10	100
21 m 1,0 ml A konz.m.S.	-	256		1									1/21	95
20 w 1,0 ml A konz.m.S.	8	32											-/20	100
19 m Tränke A 1:10	Ø	-	12	5					1	1			19/19	0
20 w Tränke A 1:10	Ø	-	4	5			1			3	2	2	17/20	15
10 m 0,1 ml B konz.i.p.	128	128											-/10	100
10 w 0,1 ml B konz.i.p.	128	-											-/10	100
19 m 1,0 ml B konz.m.S.	-	256											-/19	100
19 w 1,0 ml B konz.m.S.	128	512											-/19	100
20 m Tränke B 1:10	Ø	-	11	3		2				3			19/20	5
20 w Tränke B 1:10	Ø	256	2	4	3					5			14/20	30
3malige Vakzination in Abständen von			7 Tagen											
10 m 0,1 ml A konz.i.p.	16	64											-/10	100
10 w 0,1 ml A konz.i.p.	32	64											-/10	100
20 m 1,0 ml A konz.m.S.	8	512	1		2								3/20	85
20 w 1,0 ml A konz.m.S.	32	64											-/20	100
19 m Tränke A 1:10	Ø	-	6	8	3					2			19/19	0
20 w Tränke A 1:10	Ø	256	5	1	1	1	1	1	1	2	3		15/20	25
10 m 0,1 ml B konz.i.p.	64	128											-/10	100
10 w 0,1 ml B konz.i.p.	128	128											-/10	100
20 m 1,0 ml B konz.m.S.	64	256											-/20	100
20 w 1,0 ml B konz.m.S.	128	128								1			1/20	95
20 m Tränke B 1:10	Ø	-	1	8	5	2				1	2		19/20	5
20 w Tränke B 1:10	Ø	128	2	4	3	3	2	2	1	1			18/20	10
20 m Kontrollen	Ø	-	8	3	6		2			1			20/20	0
20 w Kontrollen	Ø	-	1	7	4	1	1	1	1	1	4		20/20	0

3.3 Ergebnisse des 2. Hauptversuches

Zur Versuchsanordnung ist zu bemerken: Beim Vorversuch und beim 1. Hauptversuch hatten wir festgestellt, daß es bei den Tiergruppen, die ausschließlich aus Männchen bestanden, zu ständigen Beißereien zwischen den einzelnen Tieren kam. Zahlreiche männliche Mäuse trugen durch diese intraspezifischen Kämpfe Verletzungen davon, die besonders in der Abheilungsphase oft nicht leicht von Ektromelieveränderungen zu unterscheiden waren. Die ständige Unruhe unter den Tieren gab zu der Überlegung Anlaß, daß dieser Stressfaktor sich nachteilig auf den Ausgang der Testinfektion auswirken könnte. So benutzten wir für diesen Versuch mit Ausnahme von 3 kleinen Gruppen männlicher Tiere ausschließlich weibliche Mäuse.

Im 1. Hauptversuch hatten wir die Immunisierung über das Trinkwasser mit einer 1:10 verdünnten Vakzine vorgenommen, ohne dadurch einen Immunisierungseffekt zu erzielen. Im jetzigen Versuch boten wir deshalb den Vacciniavirus-Stamm CVA nicht nur 1:10 verdünnt, sondern auch konzentriert als Trinkvakzine an. Darüberhinaus ließen wir Mäusegruppen vor der Impfung eine Nacht lang dürsten bzw. hungern und dürsten. Den 1:10 verdünnten Impfstoff erhielten die Tiere nur über Tränkflaschen. Den konzentrierten Impfstoff konnten die Mäuse sowohl aus Tränkflaschen ad libitum als auch aus Petrischalen aufnehmen. Hierbei standen 1 ml pro Maus zur Verfügung. Es zeigte sich, daß die Tiere den in Petrischalen angebotenen Impfstoff in der Regel innerhalb weniger Stunden tranken. Die Tränkflaschen wurden dagegen oft auf Grund der größeren Impfstoffmenge erst nach 1 - 2 Tagen geleert. Wasser erhielten alle Gruppen erst dann, wenn die Trinkgefäße gänzlich geleert waren.

Auf diese Weise immunisierten wir die Mäuse dreimal in Abständen von 3 Tagen. Weitere Einzelheiten über die Versuchsanordnung zeigt Tabelle 3.

Die Untersuchung gepoolter Serumproben aller Gruppen auf hämagglutinationshemmende Antikörper ergab einen eindeutig positiven Titer bei i.p. immunisierten Tieren. Alle weiblichen Tiergruppen, die das Impfvirus entweder mittels Sonde oder als Trinkvakzine nach einer Nacht hungern und dürsten erhalten hatten, bildeten nur fragliche Titer von 1:4 aus. Eine Ausnahme stellte die Gruppe weiblicher Mäuse dar, die vor der Immunisierung nur gedurstet hatte. Hier kam es, wie auch bei den 3 männlichen Vergleichsgruppen, zu keiner Antikörperbildung.

Der Ausgang des Belastungsversuches bestätigte das Ergebnis des 1. Hauptversuches. Wiederum waren alle i.p. immunisierten Tiere geschützt, auch die Verabreichung des Impfstoffes mittels Sonde führte zu einer guten Immunität (Überlebensrate 83 %). Die verendeten Tiere dieser Gruppe kamen bereits bis zum 8. Tag p.i. ad exitum, alle anderen zeigten keine Störungen des Allgemeinbefindens.

Die selbständige, orale Aufnahme von Impfvirus war bei allen Gruppen wenig immunogen wirksam. Die Überlebensrate belief sich auf nur 20 - 0 %. Die Absterbemaxima lagen bei allen Mäusen um den 7. - 8. Tag p.i. Später (11. - 18. Tag p.i.) verendete Tiere zeigten typische Ektromeliesymptome: Apathie und Verweigern des Futters, pumpende Atmung, Schwellungen und umschriebene Auftreibungen an Schwanz und Extremitäten sowie eitrig-eitrige Konjunktivitiden und Blepharitiden waren die Leitsymptome. Amputationen kamen nicht vor. Die wenigen Tiere der Tränkeversuche, die die Infektion doch noch überlebten, zeigten die gleiche Symptomatik, sie waren jedoch 3 Wochen p.i. wieder klinisch unauffällig.

Tabelle 8: Hämagglutinationshemmungs-Titer, Verlauf und Ergebnis der i.p. Testinfektion mit 0,2 ml Ektromelievirus ($10^{2,5}LD_{50}$) 20 Tage nach der letzten Impfung im 2. Hauptversuch.
Tr. = Tränke

Zahl u. Geschl. d. Tiere, Dosis/ u.Applik.modus	HAH- Titer 1:	Tage p.inf. verendet													tot/ ges.	Überleb. Rate in %
		5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	18				
19 w 0,1 ml konz.i.p.	16														-/19	100
18 w 1,0 ml konz.m.S.	4 +				1 2										3/18	83
39 w Tr. 1:10 n.D.	Ø -				12 13		4 1			4 2					36/39	7
37 w Tr. 1:10 n.H.u.D.	4 +				12 18		2 1 1			1					35/37	5
5 m Tr. 1:10 n.H.u.D.	Ø -				2 2										4/5	2
39 w Tr.m.P.konz.n.D.	Ø	1	7	8 11			2 1	3 1							34/39	12
40 w Tr.m.P.konz.n.H.u.D.	4 +		5 10	7		3 1	3 1			2					32/40	20
7 m Tr.m.P.konz.n.H.u.D.	Ø -		1 2	3				1							7/7	0
9 w Tr.m.F.konz.n.H.u.D.	4 +		3	3					2						8/9	19
3 m Tr.m.F.konz.n.H.u.D.	Ø -		1	1					1						3/3	0
20 w Kontrollen	Ø		1 3 8			2		3 1							19/19	0

D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Schluckvakzinen gegen die Poliomyelitis und die Newcastle-Disease bewiesen auf breiter Basis in überzeugender Weise die Möglichkeit, wirksam gegen Virusinfektionen bei Mensch und Tier oral zu immunisieren. Seither wurden verstärkt Untersuchungen angestellt, die orale Immunisierbarkeit auch bei anderen Virusinfektionen zu überprüfen. Mitbestimmend waren dabei nicht nur Überlegungen hinsichtlich einer vereinfachten Applikationsmethode der Impfstoffe zur Immunisierung großer Populationen, sondern auch neue Kenntnisse zur Pathogenese der Viruserkrankheiten. Man ging dabei von der Vorstellung aus, daß die Nachahmung des normalen Infektionsweges mit einem Immunogen ebenfalls eine, vielleicht sogar eine bessere oder gefahrloser zu erreichende Immunität bewirken könnte als dessen zumeist geübte parenterale Applikation. Die Überlegungen spielten in besonderem Maße eine Rolle, die seither üblichen kutanen Immunisierungsmethoden gegen Pockenvirusinfektionen neu zu überdenken.

Die derzeit am meisten gebräuchliche Methode, gegen die Ektromelie der Mäuse zu impfen, besteht in der i.p. Applikation von Vacciniavirus. Mit diesem Verfahren läßt sich eine gute Immunität erzielen (71, 72). Als besonders nachteilig wird jedoch der große damit verbundene Arbeitsaufwand empfunden. Technisch noch umständlicher ist die teilweise ebenfalls geübte kutane Impfung. Sie gibt zudem weniger zuverlässige Resultate und begünstigt eine ungewollte Verschleppung des auch für Menschen pathogenen Impfvacciniavirus.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es, die grundsätzliche Durchführbarkeit einer oralen Vakzinierung von Mäusen ge-

gen Ektromelie zu überprüfen. In diesem Zusammenhang galt es, folgende Einzelfragen zu klären:

1. Ist oral verabreichtes Vacciniavirus für Mäuse im Alter von 4 - 5 Wochen unschädlich (Unschädlichkeitsprüfung)? Bestehen hierbei Unterschiede zwischen attenuiertem und nicht attenuiertem Impfvirus?
2. Immunisiert oral appliziertes Vacciniavirus und welche Virusmenge ist dafür notwendig?
3. Verbessern orale Revakzinationen den Impfschutz?
4. Gibt es Unterschiede in der immunisierenden Wirkung nach Applikation des Impfstoffes mittels Sonde und über die Tränke?
5. Bestehen Zusammenhänge zwischen dem Auftreten hämaagglutinationshemmender Antikörper und der belastbaren Immunität?
6. Sind Geschlechtsunterschiede zu berücksichtigen?

Die durchgeführten Untersuchungen belegen, daß eine orale Schutzimpfung von Mäusen gegen Ektromelie grundsätzlich möglich ist. Diese Aussage stützt sich auf die Ergebnisse der oralen Immunisierung mit Vacciniavirus bei insgesamt 653 Mäusen im Alter von 4 - 5 Wochen, die zu bestimmten Zeiten p.vacc. einer Testinfektion mit virulentem Ektromelievirus unterzogen wurden. Hierbei zeigte sich allerdings, daß die Wirkung nach Applikation des Impfstoffes mit einer Sonde in den Magen eindeutig seiner freiwilligen Aufnahme überlegen war. Nach Sondenvakzination überlebten in den beiden Hauptversuchen von 177 Tieren 95 % eine für ungeimpfte Kontrolltiere stets tödliche Testinfektion, dagegen nur 13 % von 337 Tieren, die über die Tränke immunisiert wurden.

MAYR und Mitarbeiter (13, 50, 51) benutzten bei ihren peroralen Immunisierungsversuchen gegen Geflügelpocken einen

attenuierten, homologen Virusstamm. Zur Impfung gegen die Ektromelie der Mäuse stand ein derartiger Virusstamm nicht zur Verfügung. Die Untersuchungen wurden deshalb mit dem heterologen Vacciniavirus durchgeführt. Zwei Vacciniavirus-Stämme kamen zur Anwendung: Der Stamm CVA und der Stamm CVB. Bei ersterem handelt es sich um einen durch zahlreiche Passagen in FHE-Kulturen hoch attenuierten Virusstamm. Er zeichnet sich nach MAYR und MUNZ (48) durch eine geringe Hautaffinität aus. Als Oralimpfstoff schien dieser Stamm besonders geeignet, weil er als relativ ungefährlich in Bezug auf Kontaktinfektionen für den Menschen gelten kann. Das zweite verwendete Impfvirus war der Vacciniavirus-Stamm CVB, der an embryonale Rindermuskelzellen adaptiert, aber nicht attenuiert ist. Beide Impfstoffstämme erwiesen sich nach parenteraler und oraler Applikation für die Maus als unschädlich. Krankheiterscheinungen und pathologische Veränderungen bei zur Kontrolle getöteten und seziierten Mäusen waren nicht zu beobachten.

Nach den Erfahrungen bei der Pockenschutzimpfung des Menschen und des Geflügels ist eine erfolgreiche Vakzinierung nur von Lebendimpfstoffen zu erwarten. Die Anwendbarkeit der beiden Virusstämme hing deshalb davon ab, ob es bei Stalltemperaturen und bei Verdünnung mit Leitungswasser zu einem erheblichen und nicht vertretbaren Titerverlust innerhalb von 24 Stunden kommt. Die Überprüfung des Stammes CVA ließ jedoch eine gute Stabilität unter den Versuchsbedingungen erkennen. Ein Titerverlust, der die immunogene Wirkung stark herabgesetzt hätte, war bei Temperaturen um 22°C innerhalb der für die Versuche notwendigen Zeit auf Grund der Titrationsergebnisse nicht zu erwarten.

Die zur Erzielung einer guten Immunität gegen Newcastle-Disease notwendige Mindestmenge an Impfvirus in einer Trink-

wasservakzine ist bekannt. Auch die erfolgreiche kutane Impfung gegen Pockeninfektionen ist an einen Mindesttiter der Impfstoffe gebunden. Im allgemeinen besitzen die kutan zu applizierenden Geflügelpocken-Impfstoffe Titer von 10^5 Ei-ID₅₀/ml bzw. 10^6 KID₅₀/ml. Der Pockenschutzimpfstoff des Menschen ist auf einen Mindestvirusgehalt von 10^8 pockenbildenden Einheiten/ml eingestellt. Bei den vorliegenden Experimenten enthielten der CVA-Impfstoff $10^{7,5}$ KID₅₀/ml, der CVB-Impfstoff $10^{6,75}$ KID₅₀/ml. Im Vorversuch wurden von ersterem 0,01 ml konzentriert i.c., je 0,5 ml konzentriert i.p., i.m., i.v. und s.c., 0,5 und 1,0 ml konzentriert mit Sonde, 1,0 ml 1:10 verdünnt und 1,0 ml 1:100 verdünnt mit Sonde, sowie 10 ml 1:10 verdünnt (entsprechend $10^{7,5}$ KID₅₀) und 10 ml 1:100 verdünnt (entsprechend $10^{6,5}$ KID₅₀) pro Tier als Trinkvakzine verabreicht. Die Dosierungen in den beiden Hauptversuchen beliefen sich bei beiden Impfstoffen auf 0,1 ml konzentriert i.p., 1,0 ml konzentriert mit Sonde, 1,0 ml konzentriert und 10 ml 1:10 verdünnt (entsprechend $10^{7,5}$ KID₅₀) als Trinkvakzine.

Eine immunogene Wirkung war im Vorversuch mit einmal applizierten Dosen, die freiwillig per os von den Tieren aufgenommen wurden, nicht erkennbar. Eine bessere, wenn auch nicht befriedigende Wirkung zeitigte bei weiblichen Tieren die zweimalige orale Immunisierung über das Trinkwasser.

Auch die Hauptversuche, die an einem wesentlich größeren Tiermaterial durchgeführt wurden, erbrachten mit dieser Methode kein durchschlagendes Ergebnis. Selbst ein erhoffter Booster-Effekt durch dreimalige Verabreichung von Trinkwasservakzine in Abständen von 3 oder 7 Tagen blieb bei männlichen Tieren völlig, bei weiblichen weitgehend wirkungslos.

Überraschenderweise führte die Verabreichung des Impfstoff-

fes mittels einer Sonde zu einer wesentlich besseren Immunität. Dies war schon beim Vorversuch bemerkbar, trat aber besonders deutlich bei den Hauptversuchen in Erscheinung. Der mittels Sondenfütterung erzielte Infektionsschutz nach dreimaliger Applikation war dem einer intraperitonealen Immunisierung vergleichbar. Unterschiede im Impfintervall von 3 und 7 Tagen traten ebensowenig auf, wie Differenzen in der Wirksamkeit der beiden Impfstoffe.

Bei einer Wertung der durch alle Immunisierungsmethoden erzielten belastbaren Immunität darf jedoch die Dosis des zur Testinfektion verwendeten Ektromelievirus nicht unberücksichtigt bleiben. Sie war in den vorliegenden Versuchen so hoch, daß stets die Masse der Kontrolltiere innerhalb von 5 - 10 Tagen verstarb. Eine natürliche Infektion dürfte nur selten von einer derart hohen Infektionsdosis ausgelöst werden. Es ist deshalb denkbar, daß ein besserer Infektionsschutz nachweisbar gewesen wäre, hätte man den Belastungsversuch mit einer wesentlich geringeren Dosis von Ektromelievirus durchgeführt. Die Auswertung der Versuche wäre allerdings durch das Entstehen protrahierter, chronischer oder subklinischer und latenter Verlaufsformen wesentlich erschwert worden.

Die beschriebenen Befunde bei Sondenvakzinierung stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen von MAYR et al. (13, 50, 51). Diese Autoren bemerkten eine schlechtere Immunisierung von Küken gegen Geflügelpocken durch Verabreichung des Impfstoffes mittels Pipette im Vergleich zur Trinkwasservakzinierung. Sie diskutieren für das schlechtere Abschneiden der Pipettenimpfung, daß hierbei der Impfstoff zu schnell abgeschluckt wird, so daß es nicht zu einem intensiven Kontakt des Virus mit der Schleimhaut des oberen Verdauungstraktes bzw. auch des Respirationstraktes kommt. Bei der

kontinuierlichen Aufnahme des Trinkwassers scheinen demnach beim Kücken bessere Respirationsverhältnisse im oberen Schleimhautbereich vorzuliegen.

Die in vorliegender Arbeit nachgewiesene wirksamere Immunisierung mittels Sonde könnte wie folgt erklärt werden: Bei der oralen, freiwilligen Aufnahme der Trinkvakzine verliert das Impfvirus bei der Passage durch den Magen seine immunogene Wirkung, weil die abgeschluckten geringen Impfstoffmengen durch den sauren Magensaft rasch inaktiviert werden. Nach den Angaben der Literatur (41) reicht hierzu die Azidität des Magensaftes voll aus. Bei Kaninchen und Mensch liegen die pH-Werte um 1 - 2. Eigene Prüfungen ergaben für den Magensaft der Maus Werte von pH 1,5 - 2,5. Bei der Applikation mittels Sonde werden dagegen relativ große Impfstoffvolumina den Tieren einverleibt. Diese passieren gleichsam als Massendruckklysma schnell den Magen und werden deshalb auch weniger stark vom sauren Mageninhalt beeinflusst.

Es ist aber auch denkbar, daß für das Vacciniavirus tierartlich unterschiedliche Resorptionsbedingungen im oberen Verdauungs- und Respirationstrakt (lymphatischer Rachenring) vorliegen. Bei den Versuchen von MAYR et al. (13, 50, 51) nahmen Kücken bei einer Trinkwasservakzinierung gegen Geflügelpocken weniger Impfvirus - allerdings homologes - pro Zeiteinheit auf, als bei dessen Applikation mittels Pipette. Trotzdem waren sie bei ersterem Verfahren besser geschützt. Für das Ektromelievirus bräuchte diese Annahme keine Gültigkeit zu haben. Man könnte sich vorstellen, daß die bei einer natürlichen Infektion über den lymphatischen Rachenring aufgenommene Ektromelievirusmenge genügt, um eine entsprechende Infektion in Gang zu bringen, während dort resorbiertes Vacciniavirus nicht zur Immunisierung ausreicht.

Die erfolgreiche orale Immunisierung mittels Sonde ließ sich in der Regel auch serologisch im Auftreten hämagglutinationshemmender Antikörper verfolgen. Während die ein- und mehrmalige Trinkwasservakzinierung kaum und unregelmäßig zu einer Bildung dieser Antikörper führte, konnten HAH-Titer von 1:4 bis 1:128 bei den meisten Versuchen mit Sondenimpfung festgestellt werden. Wie die Ergebnisse der Testinfektion zeigen, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Impfschutz und nachgewiesenen Antikörpern.

Die Hämagglutinationshemmungs-Titer des 1. Hauptversuches sprechen ferner dafür, daß der Stamm CVB höhere Antikörpertiter hervorzurufen vermag, als der Stamm CVA. Die Belastungsversuche ließen jedoch einen Stammesunterschied in der immunogenen Wirkung nicht erkennen.

Die unterschiedliche, geschlechtsgebundene Empfänglichkeit der Maus gegenüber einer Ektromelievirusinfektion wurde schon mehrfach beschrieben (40, 64, 65, 71, 72). Sie bestätigte sich auch in den vorliegenden Versuchen. Männliche Tiere erlagen eindeutig häufiger der Infektion als weibliche. Die Ursache dieses geschlechtsgebundenen Verhaltens ist nicht bekannt.

Der Gesamtkomplex einer oralen Immunisierung der Maus gegen eine Ektromelieinfektion läßt sich demnach auf Grund vorliegender Versuchsergebnisse wie folgt beurteilen: Prinzipiell ist eine orale Immunisierbarkeit mit Vaccinia-virus möglich, jedoch sind dieser vorerst in praxi Grenzen gesetzt. Während eine Trinkwasservakzinierung unter praxisgerechten und wirtschaftlich vertretbaren Bedingungen keine befriedigenden Resultate lieferte, stellt die zur Erzielung einer guten Immunität notwendige Applikation des Impfstoffes mittels Sonde gegenüber der üblichen

i.p. Impfung arbeitstechnisch keinen Vorteil dar.

In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß bei Immunisierung mit dem hochattenuierten Stamm CVA keine Unterschiede in der Ausbildung einer Immunität im Vergleich zum nicht attenuierten Stamm CVB bestehen. Dies bedeutet, daß man mit einem für Menschen relativ apathogenen Vacciniavirus-Stamm Mäusepopulationen sicher und gefahrlos durch eine i.p. Applikation gegen eine Ektromelieinfektion schützen kann.

Nachtrag: Nach Abschluß des Manuskriptes wurden uns die kürzlich veröffentlichten Untersuchungen zur oralen und nasalen Immunisierung mit Poxvirus vaccinia von HOCHSTEIN-MINTZEL et al. bekannt (33, 35, 36). Die Autoren untersuchten unter anderem die mit Vacciniavirus peroral erzielbare Immunität der Maus gegen eine nachfolgende intracerebrale, homologe Testinfektion. Sie kamen dabei zu der Schlußfolgerung, daß in dem von ihnen gewählten Testsystem eine orale Immunisierung, selbst nach wiederholter Virusapplikation, nur eine unzuverlässige Wirkung zeitigte, während die i.p. Verabreichung gleich großer Impfstoffdosen bessere Ergebnisse brachte.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Unschädlichkeit und Wirksamkeit einer oralen Immunisierung mit Vacciniavirus gegen Mäusepocken wurden in einem Vorversuch und zwei Hauptversuchen an insgesamt 653 Mäusen im Alter von 4 - 5 Wochen getestet. Im Vorversuch erfolgte bei einem Teil der Tiere eine Revakzination nach 71 Tagen. In den Hauptversuchen kamen die Mäuse dreimal in Abständen von 3 oder 7 Tagen zur Impfung. Es wurde vergleichend über das Trinkwasser, mittels einer Sonde in den Magen und parenteral vakziniert.

Als Impfstoffe dienten der attenuierte Vacciniavirus-Stamm CVA "Ankara" der 541. - 544. Passage in FHE-Zellen und vergleichsweise im 1. Hauptversuch der Vacciniavirus-Stamm CVB "Bern".

Die Unschädlichkeit der Impfstoffe wurde durch klinische Beobachtung und Probesektionen geprüft, die erzielte Immunität durch Nachweis hämagglutinationshemmender Antikörper und durch Testinfektionen mit virulentem Ektromelievirus. Dabei erfolgte der Antikörpernachweis im Vorversuch 10 bzw. 21 Tage nach der Erstimpfung und 10 Tage nach der Revakzination, im 1. Hauptversuch 14 Tage und im 2. Hauptversuch 20 Tage nach der letzten Impfung. Die Testinfektionen mit $10^{2,5} LD_{50}$ fanden im Vorversuch 106 Tage nach der Erstimpfung (bzw. 35 Tage nach der Revakzination), im 1. Hauptversuch 14 Tage und im 2. Hauptversuch 20 Tage nach der letzten Vakzination statt.

Aus den Versuchen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Eine orale Immunisierung von Mäusen mit Vacciniavirus gegen die Infektiöse Ektromelie ist prinzipiell möglich.

2. Die verwendeten Impfstoffstämme waren bei peroraler und parenteraler Applikation unschädlich. Unterschiede in ihrer immunogenen Wirksamkeit bestanden nicht.
3. Eine gute und belastbare Immunität ließ sich nur durch eine in Abständen von 3 bzw. 7 Tagen verabfolgte dreimalige Applikation der Impfstoffe mit einer Sonde erzielen. Die Gesamtdosis betrug dabei für den Impfstoff CVA $3 \times 10^{7,5} \text{KID}_{50}$ und $3 \times 10^{6,75} \text{KID}_{50}$ für die Vakzine CVB. 95 % von 177 Tieren überstanden nachfolgende Belastungsversuche, bei denen die intraperitoneal immunisierten Mäuse zu 100 % resistent waren, die Kontrolltiere jedoch stets alle der Infektion erlagen.
4. Die freiwillige Aufnahme der Impfstoffe über die Tränke führte nur zu einer sehr unbefriedigenden Immunität. Nach einer dreimaligen oralen Aufnahme von ca. $10^{7,5} - 10^{8,5} \text{KID}_{50}$ innerhalb von 1 - 2 Tagen überlebten nur 13 % von 337 Tieren die Testinfektion.
5. Die bedeutend geringere immunogene Wirkung der Tränken gegenüber Sondenvakzinierung wird mit dem virusschädigenden Einfluß des sauren Magensaftes auf geringe Impfstoffvolumina erklärt.
6. Immunisierte Tiergruppen mit nachweisbaren Hämagglutinationshemmungs-Titern waren in der Regel gegen die Testinfektion immun. Das Fehlen von hämagglutinationshemmenden Antikörpern in Serumpools war jedoch nicht immer mit einem völlig unzureichenden Infektionsschutz verbunden.
7. Die in der Literatur beschriebene größere Empfänglichkeit männlicher Mäuse gegenüber einer Ektromelievirus-Infektion wird bestätigt.
8. Das Ergebnis der Versuche läßt erkennen, daß eine perorale Immunisierung von Mäusen mit Vacciniavirus gegen

Mäusepocken in praxi die Vorteile einer intraperitonealen Immunisierung weder in arbeitstechnischer Hinsicht noch in der sicheren Wirkung aufwiegt.

9. Der für Menschen relativ apathogene, hochattenuierte Vacciniavirus-Stamm CVA eignet sich für die intraperitonealen Immunisierung genau so gut wie der nicht attenuierte Stamm CVB.

SUMMARY

The safety and efficacy of oral immunisation with vaccinia virus against mouse pox was tested in one pre-experiment and two main-experiments in 653 4-5 week old mice. In the pre-experiment one part of the animals were revaccinated after 71 days. In the main-experiments the mice were vaccinated three times at an interval of 3 or 7 days. The animals were immunized for comparison via drinking-water, by a tube into the stomach and parenterally.

The attenuated vaccinia virus-strain CVA "Ankara" of the 541.-544. passage in chick embryo fibroblasts and the vaccinia virus-strain CVB "Bern" were used as strains.

The safety of the vaccines has been proven by clinical observation and post mortem examinations, their immunogenicity by demonstration of hemagglutination inhibiting antibodies and by challenge with virulent ectromelia virus. The hemagglutination inhibition-reactions were performed in the pre-experiment 10 respectively 21 days after the first vaccination and 10 days after revaccination, in the first main-experiment 14 days and in the second main-experiment 20 days after the last immunisation. The challenges with $10^{2,5} LD_{50}$ ectromelia virus were made in the pre-experiment 106 days after the first vaccination (respectively 35 days after revaccination), in the first main-experiment 14 days and in the second main-experiment 20 days after the last vaccination.

The results of the experiments can be summarized as follows:

1. An oral immunisation of mice with vaccinia virus against infectious ectromelia is possible in principle.
2. The used vaccine-strains were proven to be save after oral and parenteral application. There have been no differences in their immunogenic efficacy.

3. A good and reliable immunity could only be achieved by three applications of the vaccines by a tube using vaccination-intervals of 3 or 7 days. The total dose amounted to $3 \times 10^{7,5} \text{TCID}_{50}$ for the vaccine CVA and $10^{6,75} \text{TCID}_{50}$ for the vaccine CVB. 95 % of 177 animals survived the following challenge, in comparison to a survival rate of 100 % of the intraperitoneally immunized mice. All control-animals died.
4. The voluntary taking of the vaccines resulted only in a very unsufficient immunity. After three times ingestion of about $10^{7,5} - 10^{8,5} \text{TCID}_{50}$ within 1 - 2 days the survival rate was only 13 % of 337 animals.
5. The significant small immunogenic efficacy of drinking water-vaccination compared with tube-vaccination is explained by the virus inactivating influence of the acid gastric juice to small vaccine volumes.
6. Immunized groups of animals having demonstrable hemagglutination inhibition-titres were usually immune against challenge. On the contrary, the lack of hemagglutination inhibiting antibodies in serumpools was not always identically with a completely insufficient protection against infection.
7. The higher predisposition of male mice to an ectromelia infection could be confirmed.
8. The results of the experiments show that oral immunisation of mice with vaccinia virus against mouse pox can not compete with the advantages of an intraperitoneal vaccination neither in view of working techniques nor in respect of secure efficacy.
9. The highly attenuated, for human beings relatively non-pathogenic vaccinia virus-strain CVA is equally qualified as the non attenuated vaccinia-strain CVB for intraperitoneal immunisation of mice against infectious ectromelia.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Antoine, G. und J. Wagemans:
zit. Hochstein-Mintzel, V.
H.-Chr. Huber und H. Stickl
Die orale und nasale Immuni-
sierung mit Poxvirus vaccinia.
III. Mitteilung: Tierexperimen-
telle Untersuchungen.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Orig. B 156,
30 (1972)
2. Barski, G.:
Detection of latent ectromelia
virus infection in mice with
the aid of human cell cultures
in vitro.
Virology 10, 155 (1960)
3. Bauer, D.J.:
The chemotherapeutic activity
of compounds copper, rhodium
and certain other metals in mice
infected with neurovaccinia and
ectromelia viruses.
Brit.J.exp.Path. 39, 480 (1958)
4. Bauer D.J. und P.W. Sadler:
Derrivates of isatin beta-thio-
semicarbazone with anti-viral
chemotherapeutic activity against
ectromelia infection.
Nature, London 190, 1167 (1961)
5. Birch-Hirschfeld, L.:
Untersuchungen über Ectromelia
infectiosa.
Zbl.Bakt.I.Orig. 129, 274 (1933)
6. Bonitz, K.:
Über eine Mikromethode der Häm-
agglutination und HämadSORption
durch Vacciniavirus und ihre An-
wendbarkeit.
Zbl.Bakt.I.Orig. 177, 16 (1960)
7. Breuel, H.P.:
"Lokale Immunisierung mit nicht-
vermehrungsfähigen Mikroorganis-
men oder ihren Antigenen."
Literatur-Dokumentation, Reihe H F
Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart (1969)
8. Briody, B.A.:
Response of mice to ectromelia and
vaccinia virus.
Bact.Rev. 23, 61 (1959)

9. Burnet, F.M. und W.C. Boake: The relationship between the virus of infectious ectromelia of mice and vaccinia virus.
J.Immunol. 53, 1 (1946)

10. Burnet, F.M. and D.Lush: The propagation of the virus of infectious ectromelia of mice in the developing egg.
J.Path.Bact. 42, 469 (1936)

11. Casagrandi, O.: zit. Hochstein-Mintzel, V., H.-Chr. Huber und H. Stickl
Die orale und nasale Immunisierung mit Poxvirus vaccinia.
III. Mitteilung: Tierexperimentelle Untersuchungen.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Orig. B 156, 30 (1972)

12. Christensen, L.R., S. Weisbroth and B. Metanic: Detection of ectromelia virus and anti-ectromelia antibodies by immunofluorescence.
Lab.animal care Vol.16, No.2, 129 (1966)

13. Danner, K. und A. Mäyr: Perorale Immunisierung gegen Pocken.
3. Mitteilung: Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg bei der Trinkwasservakzinierung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten Stamm HP-1.
Zbl.Vet.Med. B 19, 609 (1972)

14. Dickinson, L.: The serological relationship between vaccinia and ectromelia viruses.
J.Hyg. 46, 378 (1948)

15. Diefenthal, W. und K.-O. Habermehl: Verhalten und Nachweis von Ektromelievirus in der Gewebekultur.
Zbl.Bakt.I.Orig. 175, 67 (1959)

16. Dulbecco, R.: Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of animal virus.
Proc.Nat.Acad.Sci. 38, 362 (1952)

17. Engelhardt, J.: Die Leukozytolyse als Zeichen der Gewebssimmunität nach der Pockenschutzimpfung (Experimentelle und klinische Untersuchungen).
Med.Diss.München (1967)

18. Fenner, F.: The immunisation of mice against ectromelia with living vaccinia virus.
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 25, 257 (1947)
19. Fenner, F.: Studies in infectious ectromelia of mice. II. Natural transmission. The portal of entry of the virus.
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 25, 275 (1947)
20. Fenner, F.: The clinical feature and pathogenesis of mouse pox (infectious ectromelia of mice).
J.Path.Bact. 60, 529 (1948)
21. Fenner, F.: The epizootic behaviour of mouse pox (infectious ectromelia of mice). II. The course of events in long-continued epidemics.
J.Hyg. 46, 383 (1948)
22. Fenner, F.: Studies in mouse pox (infectious ectromelia of mice). IV. Quantitative investigations on the spread of virus through the host in actively and passively immunised animals.
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 27, 1 (1949)
23. Fenner, F.: Studies in mouse pox (infectious ectromelia of mice). V. Closed epidemics in herds of normal and vaccinated mice.
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 27, 19 (1949)
24. Fenner, F.: Studies in mouse pox (infectious ectromelia of mice). VI. A comparison of the virulence and infectivity of three strains of ectromelia virus.
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 27, 31 (1949)
25. Fenner, F.: Mouse pox (infectious ectromelia of mice). A review.
J.Immunol. 63, 341 (1949)

26. Germer, W.D., W. Diefenthal und K.-O. Habermehl: Latente Infektion von Mäuseembryonen mit Ektromelievirus (Mäusepocken) infolge diaplacentarer Übertragung.
Z.f.Hyg. 147, 269 (1961)
27. Gledhill, A.W.: Latent Ectromelia.
Nature, London 196, 298 (1962)
28. Gönnert, R.: Weitere Untersuchungen über die Ektromelie.
Zbl.Bakt. I.Orig. 148, 294 (1942)
29. Gröppel, K.H.: Über das Vorkommen von Ektromelie (Mäusepocken) unter Wildmäusen.
Inaug.Diss.Berlin (1960)
30. Herbst, G.: zit. Hochstein-Mintzel, V., H. Huber und H. Stickl
Tierexperimentelle Untersuchungen über die orale Immunisierung mit Vaccinia-Virus.
Zbl.Bakt.I.Orig. 212, 41 (1969)
31. Herrlich, A.: "Die Pocken"
2. Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967)
32. Herrlich, A. und A. Mayr: Die Differenzierung der Tierpockenvirenⁿbebrüteten Hühnereiern.
Arch.Hyg. 139, 444 (1955)
33. Hochstein-Mintzel, V.: Die orale und nasale Immunisierung mit Poxvirus vaccinia.
I. Mitteilung: Die Kriterien der Pockenimmunität und die Immunologie der konventionell-kutanen Impfreaktion.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Orig. B 156, 1 (1972)
34. Hochstein-Mintzel, V., H. Huber und H. Stickl: Tierexperimentelle Untersuchungen über die orale Immunisierung mit Vaccinia-Virus.
Zbl.Bakt. I.Orig. 212, 41-49 (1969)
35. Hochstein-Mintzel, V., H.-Chr. Huber und H. Stickl: Die orale und nasale Immunisierung mit Poxvirus vaccinia.
III. Mitteilung: Tierexperimentelle Untersuchungen.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Orig.B 156, 30 (1972)

36. Hochstein-Mintzel, V.,
H. Stickl und H.-Chr.
Huber: Die orale und nasale Immunisierung
mit Poxvirus vaccinia.
II. Mitteilung: Neue Wege der Pocken-
impfung.
Zbl.Bakt.Hyg. I.Abt.Orig. B 156,
15 (1972)
37. Horzinek, M.: Titration der hämagglutinations-
hemmenden Antikörper gegen das
Ektromelievirus mittels der Mikro-
methode nach Takatsy.
Zbl.Bakt. I.Orig. 197, 18 (1965)
38. Horzinek, M.: Eine einfache Labormethode zur
Diagnose der Mäusepocken (Ektro-
melie).
Z.Versuchstierk. 6, 134 (1965)
39. Horzinek, M. und
W. Höpken: Serologische Untersuchungen über
die experimentelle Ektromelie der
Maus.
Zbl.Bakt. I.Orig. 197, 26 (1965)
40. Horzinek, M. und
W. Höpken: Untersuchungen über die inapparen-
te Infektion mit dem Ektromelie-
virus.
Arch.ges.Virusforschung 17, 125 (1965)
41. Huber, H., H. Stickl
und V. Hochstein-Mintzel: Kann die Pockenimpfung verbessert
werden? Untersuchungen zur oralen
Pockenimpfung.
Sonderabdruck aus "Monatsschrift
für Kinderheilkunde", Bd. 118, H.6,
381 (1970)
42. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung
pharmakologischer Reihenversuche.
Naunyn Schmiedbergs Arch.exp.Path.
Pharmak. 162, 480 (1931)
43. Karasek, E.: Möglichkeiten und Grenzen des fluores-
zenz-serologischen Nachweises von
Ektromelievirus in Organmaterial.
Z.Versuchstierkunde, Bd. 11, 222 (1969)
44. Knosh, O.V.: zit. Herrlich, A.
"Die Pocken"
2. Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967)

45. Marchal, J.: Infectious ectromelia, a hitherto undescribed virus disease of mice.
J.Path.Bact. 33, 713 (1930)
46. Mayr, A.: Experimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei den Tierpockenviren.
Arch.ges.Virusforsch. 6, 438 (1956)
47. Mayr, A., H. Mahnel und E.Munz: Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren.
Zbl.Vet.Med. B 19, 69 (1972)
48. Mayr, A. und E. Munz: Veränderungen von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen.
Zbl.Bakt. I.Orig. 195, 24 (1964)
49. Mayr, A. und E. Munz: "Die Pockenschutzimpfung (Das Vaccinevirus)."
Sonderdruck in "Handbuch der Schutzimpfungen" von A. Herrlich - Springer Verlag /Berlin, Heidelberg, New York (1965)
50. Mayr, A., M. Rath und K. Danner: Perorale Immunisierung gegen Pocken.
1. Mitteilung: Untersuchungen über eine Schutzimpfung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten H-Stamm HP-1.
Zbl.Vet.Med. B 18, 347 (1971)
51. Mayr, A., M. Rath und K. Danner: Perorale Immunisierung gegen Pocken.
2. Mitteilung: Untersuchungen über eine kombinierte Schluckimpfung gegen Hühnerpocken und Newcastle-Disease.
Zbl.Vet.Med. B 18, 441 (1971)
52. Mims, C. A.: The response of mice to large intravenous injections of ectromelia virus. II. The growth of virus in the liver.
Brit.J.exp.Path. 40, 543 (1959)
53. Mooser, H.: zit. Röhrer, H.
"Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren."
Band II, Spezieller Teil I
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1967)

54. Munz, E.: Persönliche Mitteilung (1971)
55. Nöller, H. G.: Die Blutentnahme aus dem retro-orbitalen Venenplexus.
Klin.Wschr. 33, 770 (1955)
56. Pearson, A.: Attempted control of ectromelia in a mouse-breeding colony.
Nature, 180, 1300 (1957)
57. Raettig, H.: Tierexperimente zur oralen Immunisierung mit inaktiviertem Antigen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 182, 525 (1961)
58. Raettig, H.: Tierversuche zur Wirkungsweise der Aristolochiasäure (Tardolyt).
Zbl.Bakt.I.Ref. 219, 179 (1969)
59. Raettig, H.: Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorganismen. Zehn Jahre Forschung im Robert Koch-Institut. Sonderdruck in "Bundesgesundheitsblatt"
14. Jahrg. Nr. 11, 141 (1971)
60. Röhrer, H.: "Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren".
Band II, Spezieller Teil 1.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1967)
61. Rohde, W. und A. Karasek: Zur Serodiagnostik der Ektromelie bei Versuchsmäusen.
Arch.exp.Vet.Med.Bd. 24,H.2, 655(1970)
62. Rolle, M. und A. Mayr: "Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre".
3. Auflage
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1966)
63. Salaman, M.H. und A.J.H. Tomlinson: Vaccination against mouse pox: with a note on the suitability of vaccinated mice for work on chemical induction of skin tumors.
J. Path.Bact. 74, 17 (1957)
64. Schell, K.: Studies on the innate resistance of mice to infection with mouse pox. I. Resistance and antibody production.
Austr.J.exp.Biol. 38, 271 (1960)

65. Schell, K.: Studies on the innate resistance of mice to infection with mouse pox. II. Route of inoculation and resistance and some observations on the inheritance of resistance. Austr.J.exp.Biol. 38, 289 (1960)
66. Schmudde, R.: Vergleichende orale, nasale und rektale Impfung von Mäusen mit inaktivierten *S. typhi-murium*-Bakterien mit und ohne Dimethylsulfoxyd-Zugabe. Inaug.Diss., Berlin (1968)
67. Trentin, J.J. und B.A. Briody: An outbreak of mouse pox (infectious ectromelia) in the United States. II. Definitive Diagnosis. Science 117, 227 (1953)
68. Trentin, J.J. und M.A. Ferrigno: Control of mouse pox (infectious ectromelia) by immunization with vaccinia virus. J.Nat.Cancer Inst. 18, 757 (1957)
69. Volkheimer, G.: Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für großkorpuskuläre Elemente. Z.f.Gastroenterologie, 2, 57 (1964)
70. Volkheimer, G.: zit. Hochstein-Mintzel, V., H. Huber und H. Stickl Tierexperimentelle Untersuchungen über die orale Immunisierung mit Vaccinia-Virus. Zbl.Bakt. I.Orig. 212, 41 (1969)
71. Zeller, H. und G. Reckzeh: Zur Immunisierung der weißen Maus gegen Ektromelie mit aktivem Vaccine-Virus. I. Mitteilung. Methoden und Grundlagen Zbl.Bakt. I.Orig. 195, 282 (1965)
72. Zeller, H. und G. Reckzeh: Zur Immunisierung der weißen Maus gegen Ektromelie mit aktivem Vaccine-Virus. II. Mitteilung. Zbl.Bakt. I.Orig. 197, 34 (1965)

Herrn Akad. Dir. Priv. Doz. Dr. E. M u n z
möchte ich besonders herzlich für die Über-
lassung des Themas und seine freundliche
Hilfe danken.

Herrn Dr. E. G ö b e l und Herrn M. R e i -
m a n n danke ich an dieser Stelle für die
jederzeit bereitwillig gewährte Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 2. Dezember 1940 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Karl Hoffmann und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Siebert, in Riesa/Elbe geboren.

Nach 5 Volksschulklassen in Heiligenstadt im Eichsfeld und Randersacker bei Würzburg trat ich 1952 in das Realgymnasium für Jungen in Würzburg ein. Nach der mittleren Reife begann ich bei der Deutschen Bundespost ein zweijähriges Schlosserpraktikum zum Zwecke eines späteren Ingenieurstudiums. Im Herbst 1960 gab ich jedoch das Praktikum auf und besuchte die Carl-Schurz-Schule (Realgymnasium) in Frankfurt am Main, wohin unsere Familie verzogen war. März 1963 bestand ich dort das Abitur.

Von 1963 - 1965 diente ich in der Bundeswehr.

Im Wintersemester 1965/66 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Sommer 1970 schloß ich es mit dem Staatsexamen ab.

